



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

INDICADORES DE STRESS OXIDATIVO EM ESTIRPES DE CIANOBACTÉRIAS E MICROALGAS

Alíria José da Silva Fernandes

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente – Tecnologias Ambientais

Orientador: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

Co-orientador: Doutor Paulo José Morais Simão Baptista Pereira

Júri:

PRESIDENTE – Doutora Elizabeth da Costa Neves Fernandes de Almeida Duarte, Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

VOGAIS – Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
- Doutor Paulo José Morais Simão Baptista Pereira, Investigador Auxiliar do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge;
- Mestre Catarina Isabel Prata Pereira Leitão Churro, Bolseira de Investigação do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, na qualidade de especialista

Lisboa, 2009

**“The sudden appearance of cyanoHABS can be viewed
as a visible and dramatic warning of the dangers that
arise from decades of abuse of our inland waters
the canary in the coal mine analogy”**

Wayne Carmichael

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas e instituições, que contribuíram de diversas formas para a realização deste trabalho, presto o meu reconhecido agradecimento.

Primeiramente, gostaria de agradecer à Professora Luísa Louro e ao Professor Miguel Mourato pela sugestão do tema que se revelou deveras interessante. Tenho a agradecer a colaboração em todas as fases do trabalho, quer como vozes críticas em relação a aspectos do delineamento e parte experimental, bem como pelas sugestões transmitidas que me incentivaram na fase de optimização dos protocolos, não esquecendo a ajuda preciosa na revisão da parte escrita. Estes agradecimentos são extensíveis ao meu percurso académico, pois sempre fui recebida no gabinete com um sorriso, qualquer que fosse a minha dúvida/dilema.

Ao Doutor Paulo Pereira, meu supervisor no INSRJ, pela cedência do laboratório e uso de equipamento, bem como pelo acompanhamento prestado.

À Catarina, meu braço direito no INSRJ, pelo apoio imensurável na realização deste trabalho. Agradeço a total disponibilidade, entusiasmo, acompanhamento e amizade que sempre demonstrou. Aos restantes membros do LME, agradeço a grande simpatia com que fui recebida.

Ao DBEB, secção de Genética, pelo empréstimo do homogeneizador ultrasónico, bem como pela disponibilização dos microscópios.

Ao pessoal do Departamento de Química Agrícola e Ambiental que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em particular à Christine.

À Cláudia, Cátia, Sérgio Baptista e Zé Augusto por toda a disponibilidade, motivação e sentido de humor com que sempre me presentearam. Não podia deixar de agradecer às “Patrícias” e Tânia pela amizade criada ao longo destes anos.

Ao Sérgio Baptista e à Inês, meus companheiros de laboratório, pela companhia e pelas conversas divertidas que fomos tendo neste período que passamos juntos.

Aos meus amigos, em particular aos que conviveram de forma mais próxima durante este período de trabalho (Carlos, Joana, Umesh, Hugo), agradeço o incentivo e apoio que me deram energia nas alturas mais desgastantes.

Ao meu maninho lindo, agradeço o apoio incondicional e paciência necessária para me aturar. Ao meu pai agradeço a compreensão, apoio e carinho transmitidos ao longo desta jornada. Obrigada por me incutires o gosto pela ciência. É um orgulho ser tua filha.

Agradeço à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro (FCT-PTDC/AMB/60351/2006) dado a este projecto.

RESUMO

Os danos oxidativos e a resposta antioxidante induzida pelo Cu^{2+} e triptamina em cianobactérias (*Anabaena* sp., *Aphanizomenon gracile*) e clorófitas (*Ankistrodesmus falcatus*) foram medidos pretendendo determinar se estas espécies possuem diferente eficiência na remoção de EROs. O Cu^{2+} e a triptamina induziram níveis mais elevados de MDA, produto final da peroxidação lipídica, e consequentemente maiores danos oxidativos em cianobactérias que na clorófitas. Tal poderá estar relacionado com a maior indução da CAT e APX em *A.falcatus*, tornando este isolado mais eficiente na sequestração do H_2O_2 . Embora não se tenham detectado diferenças significativas na actividade da CAT, verificou-se em ambas as culturas um aumento significativo na actividade da APX após exposição a triptamina. Por outro lado, em *A. falcatus* registou-se uma indução significativa ($p < 0,05$) na actividade da CAT e APX após 24 horas de exposição a $50 \mu\text{M}$ Cu^{2+} indicando a actuação destas enzimas na sequestração de H_2O_2 . Estes resultados sugerem que os mecanismos de defesa em *A. gracile* são menos eficientes na remoção de EROs que em *A. falcatus*. Consequentemente *A. gracile* deverá ser uma espécie mais susceptível ao stress e *A. falcatus* mais tolerante ao mesmo.

Palavras – Chave: Triptamina, Cu^{2+} , danos oxidativos, resposta antioxidante, cianobactérias, clorófitas

ABSTRACT

Oxidative damage and antioxidant responses induced by Cu^{2+} and tryptamine on cyanobacteria (*Anabaena* sp. and *Aphanizomenon gracile*) and chlorophyte (*Ankistrodesmus falcatus*) were analyzed to determine if these species have different efficiency for the removal of ROS. Cu^{2+} and tryptamine induced higher levels of MDA, a lipid-peroxidation product, and consequently more oxidative damage, in the cyanobacteria than in chlorophyte. This is probably related to the higher induction of CAT and APX in *A. falcatus*, which leads this isolate to a more efficient scavenging of H_2O_2 . While no significant changes in CAT activity were detected, both cultures showed an increased in APX activity following tryptamine exposure treatments. On the other hand, *A. falcatus* showed a significant ($p < 0,05$) increase in CAT and APX activity after 24 hours exposure to $50 \mu\text{M}$ Cu^{2+} , indicating the involvement of these enzymes in H_2O_2 scavenging. These results suggest that the cellular defense mechanisms triggered by *A. gracile* were less efficient than the ones triggered by *A. falcatus* for the removal of ROS. Therefore *Anabaena* sp. might be more stress susceptible and *A. falcatus* more stress-tolerant species

Key – words: Tryptamine, Cu^{2+} , oxidative damage, antioxidant responses, cyanobacteria, chlorophyte

EXTENDED ABSTRACT

In the last few decades an excessive development of cyanobacteria in freshwaters has been occurring as a result of increasing eutrophication. Due to the presence of high levels of cyanobacterial biomass and toxins in recreational and drinking waters, Cyanobacteria Harmful Blooms (CHABs) have become an increasingly visible environmental and economical problem. Therefore, the control of algal growth in eutrophic water bodies is an urgent issue. Although much attention has been given in recent decades and several strategies for cyanobacterial blooms control are available, the use of many of them is limited to special cases. One strategy consists of adding some chemicals toxic to cyanobacteria (eg. copper sulfate, copper chelates, potassium permanganate, simazine, atrazine, paraquat, diuron). Copper sulfate application to surface waters has been practiced for decades, providing a quick solution for cyanobacteria problems in lakes and ponds. Unfortunately, the long-term side-effects outweigh the short-lived benefits. These compounds have several negative qualities including broad-spectrum toxicity towards beneficial phytoplankton and accumulation of Cu^{2+} in the bottom sediments. This high persistence negatively affects the benthic community and environment. For drinking water ponds, there is also concern about copper-induced release of toxins from some toxin species of cyanobacteria that can cause gastrointestinal distress, liver failure, and even death.

Recently there's been an important development of environment-friendly and promising methods to control *bloom* forming cyanobacteria such as *Anabaena* sp. and *Aphanizomenon gracile*. Hundreds of new natural compounds isolated from bacteria, fungi, macrophyta, higher plants, algae or cyanobacteria have been tested for their potential selective algicidal effects. Because they are natural products, and so degrade faster with less probability to disturb environment, some of these compounds have been reported to have a strong potential for environmentally friendly control of CHABs. The indole alkaloid tryptamine is an important allelochemical produced by a number of higher plants, like *Acacia* sp., and animals. Various organisms such as *Escherichia coli*, *Tetrahymena pyriformis* are reported to be inhibited or affected by tryptamine. However, the exploration for antialgal activity of tryptamine is limited. Previous studies showed that tryptamine prevents the growth of most cyanobacteria and eukaryotic microalgae at similar concentrations. However, while most of the eukaryotic microalgae recovered growth after being transferred to new tryptamine – free culture media, most of cyanobacteria showed no grow recovery. As these species co-exist in the same environment, we hypothesized that they may have different strategies to cope with copper and tryptamine.

Copper and tryptamine toxicity can induce oxidative stress as a result of the increase in intracellular concentration of reactive oxygen species (ROS). Excess ROS can cause oxidative damage affecting cellular components such as proteins, lipids and nucleic acids, causing changes in the metabolism and cellular structure.

In this work we evaluate the effect of copper sulfate on the growth of cyanobacteria (*Anabaena* sp.) and chlorophyte (*Ankistrodesmus falcatus*) over a broad range of compound concentrations (1 to 20 μM). The observed differences might be related to different sensitivities found between *Anabaena* sp. and *A. falcatus* to the screened compound. In fact the $\text{IC}_{50_{192 \text{ hours}}}$ values of copper toward the cyanobacteria (6, 62 μM) were lower than the $\text{IC}_{50_{192 \text{ hours}}}$ obtained for chlorophyte (17 μM). Oxidative damage and antioxidant responses induced by copper and tryptamine on cyanobacteria (*Anabaena* sp. and *Aphanizomenon gracile*) and chlorophyte (*Ankistrodesmus falcatus*) were also analyzed. This was tested through stressing *Anabaena* sp. and *A. falcatus* with Cu^{2+} (1, 5 μM and 10, 50 μM) for 24 and 48 hours, respectively. In another experiment both *A. gracile* and *A. falcatus* were exposed for 24 hours to 3 and 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of tryptamine. The extent of lipid oxidative damage, antioxidant enzyme activities (CAT, APX) and the amount of hydrogen peroxide produce by each exposure condition were measured.

Oxidative stress was shown indirectly by the increase in lipid peroxidation (MDA) and antioxidant enzyme activities. Copper and tryptamine induced higher levels of MDA and consequently more oxidative damage in the cyanobacteria than in chlorophyte. Interestingly, MDA content in tryptamine-exposed cells of *A. falcatus* decreased significantly especially after 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ treatments. In fact the decreased in MDA content was negatively correlated ($r = 0,99$) with the increase in H_2O_2 production. This is probably related to the higher induction of hydrogen peroxide scavenging enzymes CAT and APX in *A. falcatus*, which leads this isolate to a more efficient scavenging of H_2O_2 . While no significant changes in CAT activity were detected, both cultures showed an increased in APX activity following tryptamine exposure treatments. On the other hand, *A. falcatus* showed a significant increase in CAT and APX activity after 24 hours exposure to 50 μM Cu^{2+} , indicating the involvement of these enzymes in H_2O_2 scavenging. These results suggest that the cellular defense mechanisms triggered by *A. gracile* were less efficient than the ones triggered by *A. falcatus* for the removal of ROS. Therefore we classify *A. falcatus* as a more stress-tolerant species and *Anabaena* sp. as more stress susceptible.

Key – words: Tryptamine, Cu^{2+} , oxidative damage, antioxidant responses, cyanobacteria, chlorophyte

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE QUADROS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Eutrofização dulçaquícola: causas e consequências	1
1.2 Florescências de cianobactérias nocivas (CHABs)	1
1.2.1 Cianobactérias: Taxonomia, biologia e ecologia	2
1.2.2 Causas e impactos da ocorrência de CHABs	4
1.2.2.1 Cianotoxinas	5
1.2.3 Controlo de CHABs	8
1.2.4 Stress oxidativo em algas e cianobactérias	12
1.2.4.1 Formação de EROs na fotossíntese e respiração	13
1.2.4.2 Stress oxidativo e dano oxidativo	14
1.2.4.3 Formação de EROs por exposição ao cobre	14
1.2.4.4 Resposta antioxidante enzimática e não-enzimática	17
2. OBJECTIVOS	20
2.1. Objectivo Geral	20
2.2. Objectivos específicos:	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Localização dos ensaios e determinações analíticas	21
3.2. Materiais biológicos utilizados nos ensaios	21
3.2.1. Obtenção e manutenção das estirpes	21
3.2.2. Cultivo das estirpes nos reactores luminosos de plâncton	22
3.3. Compostos utilizados nos ensaios	22
3.4. Determinação de indicadores de stress oxidativo	24
3.4.1. Esquema dos ensaios	24
3.4.2. Determinação da actividade de antioxidantes enzimáticos	26
3.4.2.1 Catalase (CAT)	26
3.4.2.2 Ascorbato Peroxidase (APX)	26
3.4.3 Quantificação da Proteína Total	26
3.4.4 Determinação do Peróxido de Hidrogénio	27
3.4.5 Determinação da Peroxidação Lipídica	28
3.5 Efeito do cobre no crescimento das estirpes	28
3.6 Tratamento estatístico	29

4. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRACÇÃO	30
4.1. Considerações gerais	30
4.2. Condições de extracção	31
4.2.1. Recolha de células	31
4.2.2. Ruptura Celular	31
4.2.3. Composição do tampão de extracção	33
4.2.4. Remoção dos resíduos celulares por centrifugação	34
4.2.5. Concentração de substrato a utilizar nas leituras	34
4.2.6. Sequência analítica de preparação de extractos	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. Ensaio relativo à triptamina	38
5.1.1. Danos oxidativos induzidos pela triptamina	38
5.1.2. Efeitos da triptamina na actividade enzimática	41
5.2. Ensaio relativo ao cobre	43
5.2.1. Efeitos do Cu^{2+} no crescimento	43
5.2.2. Danos oxidativos induzidos pelo Cu^{2+}	44
5.2.3. Efeitos do Cu^{2+} na actividade enzimática	47
6. CONCLUSÃO	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXO I	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Diversidade morfológica em células cianobacterianas: <i>Aphanizomenon gracile</i> (A), <i>Anabaena circinalis</i> (B)	3
Figura 2 – Distribuição de electrões na orbital externa da molécula de oxigénio e redução desta a água com a formação de EROs na cadeia transportadora de electrões.....	13
Figura 4 – Modelo hipotético da indução de resposta antioxidante enzimática e não enzimática em <i>Anabaena doliolum</i> exposta a stress salino e por Cu^{2+} . “?” Significa que apesar de se verificarem efeitos não se conhecem as razões	19
Figura 6 – Esquema do cultivo das estirpes ensaiadas nos reactores luminosos de fitoplâncton	23
Figura 7 – Reactores luminosos de fitoplâncton correspondentes ao delineamento experimental relativo ao ensaio da triptamina: tempo exposição de 0 horas.....	25
Figura 8 – Reactores luminosos de fitoplâncton correspondentes ao delineamento experimental relativo ao ensaio do sulfato de cobre: tempo exposição de 0 horas.....	25
Figura 10 – Peroxidação lipídica (A) e nível de H_2O_2 (B) em <i>A. gracile</i> e <i>A. falcatus</i> expostas a diferentes concentrações de triptamina. A peroxidação lipídica foi medida através da produção de MDA. As barras representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados. Diferentes letras, presentes em cima das barras, denotam significância intra ou interespecífica $p < 0,05$	40
Figura 11 – Efeito de diferentes concentrações de triptamina na actividade de APX (A) e CAT (B) e proteína total (C) em <i>A. gracile</i> e <i>A. falcatus</i> . As barras representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados. Diferentes letras, presentes em cima das barras, denotam significância intra ou interespecífica $p < 0,05$	42
Figura 12 – Curvas de crescimento de <i>Anabaena</i> sp. (A) e <i>A. falcatus</i> (B) após exposição a diferentes concentrações de cobre durante um período de 192 horas. Os dados representam a média dos triplicados, os coeficientes de variação nunca excederam os 0,2 (20 %)	43
Figura 13 – Peroxidação lipídica em <i>A. falcatus</i> (A) e <i>Anabaena</i> sp. (B) e expostas a diferentes concentrações de cobre. A peroxidação lipídica foi medida através da produção de MDA. As barras representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados. Diferentes letras, presentes em cima das barras, denotam significância $p < 0,05$	46
Figura 14 – Efeito de diferentes concentrações de cobre na proteína total em <i>A. falcatus</i> (A) e <i>Anabaena</i> sp. (B) expostas a diferentes concentrações de cobre. As barras representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados. Diferentes letras, presentes em cima das barras, denotam significância $p < 0,05$	46

Figura 15 – Efeito de diferentes concentrações de cobre na actividade da CAT em *A. falcatus* (A) e *Anabaena* sp. (B) expostas a diferentes concentrações de cobre. As barras representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados. Diferentes letras, presentes em cima das barras, denotam significância $p < 0,05$ 49

Figura 16 – Efeito de diferentes concentrações de cobre na actividade da APX em *A. falcatus* (A) e *Anabaena* sp. (B) expostas a diferentes concentrações de cobre. As barras representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados. Diferentes letras, presentes em cima das barras, denotam significância $p < 0,05$ 49

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Panorâmica da ocorrência global de florescências tóxicas de organismos fotossintéticos de sintomatologia em organismos após intoxicação.....	6
Quadro 2 – Cianotoxinas mais comuns: estrutura química, géneros produtores, mecanismos de acção e sintomatologia após intoxicação.....	7
Quadro 3 – Compostos naturais com potencial algicida: organismos produtores, principais compostos activos, mecanismos de acção envolvidos e organismo alvo	10
Quadro 4 – Alterações nos sistemas antioxidantes enzimáticos em algas e cianobactérias após exposição a stress abióticos.....	18
Quadro 5 – Informação relativa às estirpes utilizadas nos ensaios.....	21
Quadro 6 – Esquema dos dois ensaios realizados e respectivas modalidades.....	24
Quadro 7 – Esquema de leituras para determinação da actividade enzimática da CAT	35
Quadro 8 – Esquema de leituras para determinação da actividade enzimática da APX	35
Quadro 9 – Composição do meio utilizado no cultivo de cianobactérias e clorófitas utilizadas nos ensaios. As quantidades foram adicionadas a 1000 mL de água desionizada.....	A
Quadro 10 – Solução de micronutrientes. As quantidades foram adicionadas a 1000 mL de água desionizada.....	A

LISTA DE ABREVIATURAS

ASA – Ascorbato

APX – Ascorbato peroxidase (s)

AZC – Ácido L-2 azetidina carboxílico

CAR – Carotenóides

DHAR – Desidroascorbato-redutase (s)

DTT – Dithiothreitol

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

EB – Ensaio em Branco

EMA – Etil 2- metilacetoacetato

EROS (s) – Espécie (s) reactiva (s) de oxigénio

GR – Glutathione redutase (s)

IC₅₀ – Concentração que inibe 50 % do crescimento celular em relação ao controle

MDA – Aldeído malónico

MDHAR – monodesidroascorbato-redutase (s)

OH[•] – Radical hidroxilo

¹O₂ – *Singleto* de oxigénio

O₂^{••} – Radical superóxido

pH – Potencial hidrogeniónico

ppm – Partes por milhão

PVP – Polivinilpirrolidona insolúvel

p/v – Peso por volume

R² – Coeficiente de correlação

SOD – Superóxido dismutase (s)

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

Tris-HCl – Tris-(hidroximetil)-aminometano

UV – Ultra-violeta

x g – vezes a gravidade

1. INTRODUÇÃO

A água doce, indispensável à vida na Terra, representa cerca de 2,5 % da hidrosfera terrestre. Grande parte desta parcela constitui os ecossistemas dulçaquícolas e desta, apenas 1% estão disponíveis para satisfação das necessidades básicas humanas (UNESCO, 2006). Não obstante, as actividades humanas modificaram acentuadamente a estrutura e função do meio ambiente provocando a deterioração na qualidade da água dos ecossistemas aquáticos (Vitousek *et al.*, 1997). Consequentemente, todos os anos mais de 2,6 biliões de pessoas têm poucas alternativas que não sejam o recurso à utilização de fontes de água potencialmente prejudiciais (UN, 2008).

1.1 Eutrofização dulçaquícola: causas e consequências

A crescente pressão antrópica sobre os recursos hídricos, materializada através de actividades como: (1) a estabilização dos cursos de água; (2) as descargas de efluentes (agrícolas, industriais e/ou urbanos), esgotos e águas residuais urbanas; (3) a queima de combustíveis fósseis; (4) e a lixiviação de fertilizantes e pesticidas de terrenos agrícolas, tem contribuído para a aceleração do processo natural de eutrofização, causando um enriquecimento artificial dos ecossistemas aquáticos em nutrientes, especialmente em formas azotadas (NH_4^+ , NO_3^-) e fosfatadas (Codd, 2000; Wassmann e Ollie, 2004; Carmichael, 2008). De acordo com Anderson *et al.* (2006) o conceito de eutrofização pode ser definido como um enriquecimento da água em nutrientes, sobretudo N e/ou P e matéria orgânica, causando um incremento no crescimento de algas e formas superiores de plantas, o que produz perturbação na estrutura, função e estabilidade dos organismos presentes na água, e na qualidade da mesma, relativamente às condições de referência.

As microalgas são uma componente natural do fitoplâncton dos sistemas dulçaquícolas desempenhando funções de importância significativa como produtoras primárias (Bartram *et al.*, 1999; Jewett *et al.*, 2008). No entanto, a eutrofização, coadjuvada por condições ambientais adequadas, potencia um incremento na taxa de crescimento de espécies dominantes, como é o caso das cianobactérias, que proliferam rapidamente, acumulando-se à superfície da água e formando florescências ou *blooms*. Os *blooms*, dependendo das espécies de cianobactérias presentes, podem produzir compostos que conferem odor e sabor à água e/ou toxinas, sendo geralmente designados como “Cyanobacterial Harmful Algal Blooms” ou CHABs (Wassmann e Ollie, 2004; Fristachi e Sinclair, 2008; Jewett *et al.*, 2008).

1.2 Florescências de cianobactérias nocivas (CHABs)

1.2.1 Cianobactérias: Taxonomia, biologia e ecologia

A taxonomia das cianobactérias está actualmente a ser alvo de revisão (Fristachi e Sinclair, 2008). De acordo com Rippka *et al.* (1979) as cianobactérias pertencem ao reino Monera, divisão Eubacteria, classe Cyanobacteria. Esta divisão engloba 150 géneros e 2000 espécies que incluem formas unicelulares solitárias ou agrupadas em colónias ou filamentos (Figura 1) (van den Hoek *et al.*, 1995; Whitton e Potts, 2000). Compreendem um grupo ancestral de microrganismos datando os registos fósseis mais antigos de 3,5 mil milhões de anos, altura que estes organismos começaram a adicionar oxigénio à atmosfera, permitindo que novas formas de vida evoluíssem (Schopf, 2000; He e Häder, 2002; Halliwell, 2006; Perovich *et al.*, 2008). A sua distribuição é ubíqua, podendo colonizar ecossistemas dulçaquícolas, marinhos e terrestres, incluindo *habitats* extremos: hipersalinos, hipertermiais, com níveis elevados de radiação UV, longos períodos de seca, entre outros (Whitton e Potts, 2000; Ward e Castenholz, 2000; Perovich *et al.*, 2008). O evidente sucesso na colonização de ecossistemas dulçaquícolas e marinhos é explicado por um conjunto de adaptações evolutivas que se traduzem em vantagens competitivas, relativamente aos restantes elementos das comunidades fitoplânctónicas, tornando-se dominantes e originando CHABs (Mur *et al.*, 1999; Hitzfeld *et al.*, 2000).

As cianobactérias possuem características semelhantes a algas, como o são, capacidade de realizar fotossíntese através da produção de pigmentos como clorofila *a* e pigmentos fotossintéticos acessórios (van den Hoek *et al.*, 1995; Carmichael, 2008). Os pigmentos acessórios asseguram protecção dos raios ultravioleta e da foto-oxidação, e permitem o aumento da capacidade de captação da luz (He e Häder, 2002; Briand *et al.* 2003; Sinha e Häder, 2008). Algumas espécies conseguem adaptar a sua composição pigmentar a alterações da qualidade da luz, conferindo-lhes a capacidade de efectuar a fotossíntese a profundidades que recebem apenas luz verde e onde os nutrientes são mais abundantes (Mur *et al.*, 1999; Briand *et al.*, 2003). As espécies plânctónicas conseguem deslocar-se na coluna de água por regulação da flutuação, através da produção ou ruptura de vesículas gasosas, permitindo-lhes obter maior disponibilidade de nutrientes inorgânicos e otimizar as condições necessárias ao processo fotossintético. O azoto, elemento importante na composição das vesículas gasosas, pode ser adquirido como nitrato, nitrito ou ião amónia, sendo o nitrato reduzido a nitrito e este a ião amónia antes de ser assimilado (Mur *et al.*, 1999; Hitzfeld *et al.*, 2000; Briand *et al.*, 2003; Carmichael, 2008).

A presença de heterocistos, células especializadas na fixação de N_2 , possibilita a gêneros como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia* e *Nostoc* a sobrevivência em condições de indisponibilidade de fontes de azoto. As formas que possuem heterocistos produzem acinetos, onde ocorre a acumulação de substâncias de reserva como o amido, permitindo a sobrevivência em condições adversas. Adicionalmente, possuem mecanismos que permitem armazenar intracelularmente fósforo na forma de polifosfato, permitindo que as células utilizem este nutriente mesmo que este esteja desfasado temporal e/ou espacialmente (Mur *et al.*, 1999; Oliver e Ganf, 2000; Briand *et al.*, 2003).

Uma das estratégias mais importantes na luta pela sobrevivência consiste na produção de metabolitos secundários que inibem ou interferem com os predadores, em particular algas (incluindo cianobactérias) e plantas aquáticas, com as quais as populações de cianobactérias poderiam competir por nutrientes e luz. Esta guerra química é denominada alelopatia (Le Grande *et al.*, 2003; Leflaive e Ten-Hage 2007; Berry *et al.*, 2008). Algumas substâncias alelopaticas produzidas por estes organismos possuem um espectro de acção bastante amplo dentro dos seres vivos, sendo altamente tóxicas para animais e o Homem (Codd *et al.*, 2005; van Apeldoorn *et al.*, 2007; Berry *et al.*, 2008, Carmichael, 2008). Esta produção pode ser vista como um mecanismo defensivo contra peixes, zooplâncton e outros herbívoros garantindo que as espécies produtoras sejam alvo de fraca apetência alimentar devida à toxicidade acumulada nas células. Isto traduz-se numa vantagem adaptativa dado que, desta forma, o zooplâncton e outros predadores preferem outro tipo de algas como fonte de alimento (Fulton e Pearl, 1988; Rohrlack *et al.*, 1999; Fialkowski e Pajdak – Stos, 2002; Malbrouck e Kestemont, 2006).

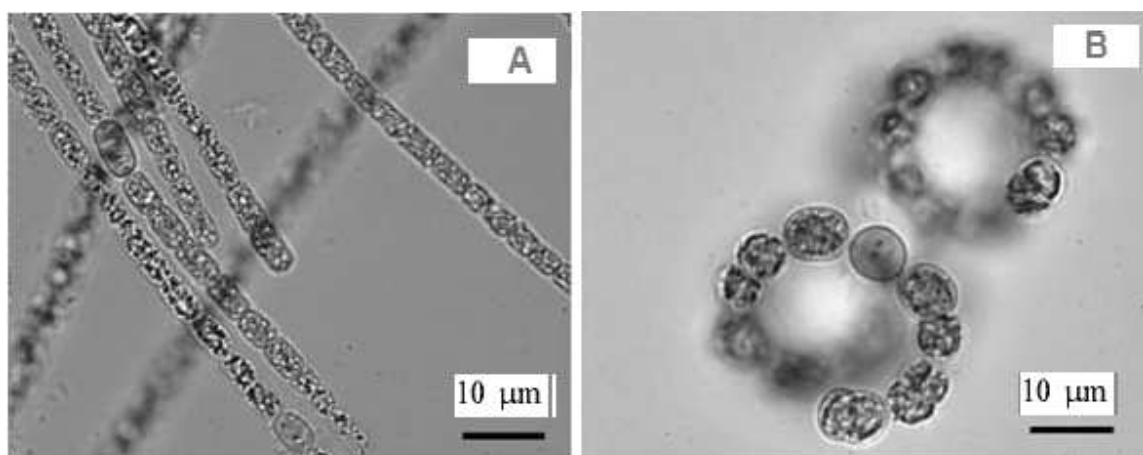


Figura 1 – Diversidade morfológica em células cianobacterianas: *Aphanizomenon gracile* (A), *Anabaena circinalis* (B) (adaptado de Churro *et al.*, 2008)

1.2.2 Causas e impactos da ocorrência de CHABs

Com a crescente eutrofização dos meios dulçaquícolas, tem vindo a verificar-se um incremento global na incidência, duração e intensidade de CHABs (Carmichael; 2008; Jewett *et al.*, 2008; Perovich *et al.*, 2008). Devido a uma complexa interacção entre os processos físicos e ecológicos torna-se difícil estabelecer uma causa única para o desenvolvimento e proliferação de CHABs. Na verdade, a ocorrência de CHABs é influenciada por uma interacção entre factores físico-químicos, hidrológicos, meteorológicos, biológicos e antropogénicos. Estes incluem a disponibilidade de nutrientes, a intensidade da luz, a temperatura, o pH, e a flutuabilidade. Apenas a combinação certa entre estes factores garante a criação de óptimas condições para o crescimento cianobacteriano (Hitzfeld *et al.*, 2000; Carmichael, 2008; Pearl, 2008; Perovich *et al.*, 2008).

Os impactos da ocorrência de CHABs variam em extensão (duração e magnitude) em função das espécies causadoras. Estes fenómenos representam riscos ambientais para os ecossistemas dulçaquícolas, não só pelo facto de poderem libertar para o meio cianotoxinas, mas também por formarem enormes aglomerados celulares verdes, “scums”, que se acumulam à superfície da água (Carmichael, 2008; Fristachi e Sinclair, 2008; Jewett *et al.*, 2008).

A presença de enormes aglomerados celulares verdes na superfície das águas poderá provocar, além de toxicidade: (1) diminuição da penetração da luz causando perturbações nas interacções tróficas com perda ou redução da biodiversidade local (Wassmann e Ollie, 2004; Fristachi e Sinclair, 2008; Lopez *et al.*, 2007); (2) danos nas guelras ou dificuldades na reprodução de peixes e invertebrados (Jewett *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2007); (3) desoxigenação das águas durante a formação/colapso dos blooms causando elevada mortalidade (Wassmann e Ollie, 2004; Fristachi e Sinclair, 2008); (4) alteração das características organolépticas da água, originada pela produção de geosmina e o 2-metilisoborneol, conduzindo a uma diminuição da apetência para o seu consumo ou uso recreativo (Schrader *et al.*, 2005; Carmichael, 2008; Jewett *et al.*, 2008; Fristachi e Sinclair, 2008); (5) impactos económicos associados a prejuízos na pesca, turismo e despesas referentes ao controlo e tratamento de florescências algais. Está estimado que os impactos económicos sejam de 82 milhões de dólares/ ano nos EUA (Fristachi e Sinclair, 2008; Jewett *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2007).

1.2.2.1 Cianotoxinas

A primeira referência na literatura científica relativa à ocorrência de CHABs remonta a 1878. Desde essa data estão reportados vários incidentes envolvendo animais domésticos e/ou selvagens e o Homem, que vão desde doença à morte dos organismos infectados (Quadro 1) (Codd *et al.*, 2005; van Apeldoorn *et al.*, 2007; Berry *et al.*, 2008, Carmichael, 2008).

De acordo com o seu modo de acção e efeito tóxico em animais, as cianotoxinas encontram-se classificadas em três classes principais: (1) neurotoxinas; (2) hepatotoxinas e; (3) dermatotoxinas ou toxinas irritantes ao tacto (Quadro 2) (Codd, 2000; Vasconcelos, 2001; Briand *et al.*, 2003). De entre os 150 géneros conhecidos de cianobactérias, encontram-se actualmente identificados 40 géneros produtores de cianotoxinas sendo os principais *Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Gloeotrichia*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Raphidiopsis*, *Schizothrix*, *Oscillatoria*, *Synechocystis* e *Synechococcus* (Codd *et al.*, 2005, Figueiredo *et al.*, 2006; Carmichael, 2008).

Existem importantes vias de exposição directa às cianotoxinas, como o são: (1) dérmica, em que ocorre absorção das toxinas durante a realização de actividades recreativas; (2) a ingestão crónica de água contaminada e/ou accidental durante actividades recreativas; (3) a utilização de água contaminada em hemodiálise; (4) a inalação, podendo ocorrer problemas respiratórios em população susceptível; (5) e o consumo de suplementos dietéticos (Kuiper – Goodman *et al.*, 1999; Hitzfeld *et al.*, 2000; Carmichael, 2008). A exposição indirecta às cianotoxinas ocorre pelo consumo de alimentos que tenham sido previamente contaminados, como peixes e/ou bivalves, que podem bioacumular cianotóxicas tornando-se vectores de toxinas para níveis tróficos superiores, incluindo o Homem (Ferreira *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2007; Ibelings e Chorus, 2007; Jewett *et al.*, 2008).

Segundo Vasconcelos (2006) a ocorrência de CHABs é frequente nos sistemas dulçaquícolas portugueses. Os principais géneros que ocorrem são *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, estando referenciada a ocorrência de microcistina em pelo menos 9 reservatórios, 3 lagos e 2 rios (Ferreira *et al.*, 2001; Saker *et al.*, 2004; Codd *et al.*, 2005b; Vasconcelos, 2006). A organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu o valor guia de 1 µg L⁻¹ para a variante microcistina – LR na água para consumo humano (WHO, 1998). Portugal transpõe este valor guia para a legislação nacional através do Decreto-lei 306/2007, de 27 de Agosto, referente à qualidade da água para consumo humano. Todavia, o estabelecimento destes limites apenas contempla os efeitos agudos da microcistina-LR, não considerando os efeitos crónicos e cancerígenos (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

Quadro 1 – Panorâmica da ocorrência global de florescências tóxicas de organismos fotossintéticos e sintomatologia em organismos após intoxicação

Data/Local	Gênero	Sintomas	Referências
Intoxicação humana por consumo de água e/ou diálise			
1979, Austrália	<i>Cylindrospermopsis</i>	140 Crianças e 10 adultos Diarreias sanguinolentas, hepatenterite	Byth, 1980 Kuiper-Goodman <i>et al.</i> , 1999
1988 Baia, Brasil	<i>Microcystis</i> <i>Anabaena</i>	2.000 Casos de gastroenterite, 88 mortes	Teixeira <i>et al.</i> , 1993
1993 Évora, Portugal	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena Aphanizomenon</i>	20 Mortes em pacientes de hemodiálise	Codd <i>et al.</i> , 2005b Araújo, 2006
1996 Caruaru, Brasil	<i>Microcystis</i>	131 Pacientes de hemodiálise, 52 mortes Distúrbios visuais, vômitos, fraqueza muscular, insuficiência renal aguda	Carmichael <i>et al.</i> , 2001 Azevedo <i>et al.</i> , 2002
Intoxicação humana por uso recreativo da água			
1989, Inglaterra	<i>Microcystis</i>	10-20 Casos de pneumonia grave após prática de natação/remo	Turner <i>et al.</i> , 1990
2002, EUA	<i>Anabaena</i>	5 Casos em jovens de 17 anos, 1 morte Náuseas, vômitos, diarreia intensa, dores abdominais fortes, falha cardíaca e morte	Behm, 2003
Intoxicação em animais			
1985, Canadá	<i>Anabaena flos-aquae</i>	500 a 1000 mortes em morcegos	Pybus e Hobson, 1986
2001, Quênia	<i>Anabaena</i>	Mortalidade em massa da população de flamingos (centenas)	Krienitz <i>et al.</i> , 2003

Quadro 2 – Cianotoxinas mais comuns: estrutura química, géneros produtores, mecanismos de acção e sintomatologia após intoxicação

Estrutura Química	Género	Mecanismo de acção/Sintomas	Referências
Neurotoxinas			
<u>Alcalóide</u> Saxitoxina e Neo-Saxitoxina Anatoxina-a Homoanatoxina-a	<i>Anabaena</i>	Actuam ao nível dos canais de sódio dos axónios e da fenda sináptica, por inibição da acetilcolinesterase ocorrendo sobre-estimulação muscular até à fadiga e subsequente paralisação dos músculos esqueléticos e respiratórios Sintomas: <ul style="list-style-type: none">Em vertebrados: hipersalivação, fraqueza muscular, lacrimação, paralisia (motora, cardíaca e respiratória), morte. Em invertebrados: redução do crescimento e resistência	Kuiper-Goodman <i>et al.</i> , 1999
	<i>Lyngbia</i>		Codd., 2000
	<i>Oscillatoria</i>		Vasconcelos., 2001
	<i>Aphanizomenon</i>		Briand <i>et al.</i> , 2003
	<i>Microcystis</i>		Ibelings e Chorus., 2007
	<i>Cylindrospermum</i>		Funari e Testai., 2008
	<i>Cylindrospermopsis</i>		
<u>Organofosfato</u> Anatoxina-a	<i>Planktothrix</i> <i>Anabaena</i>		
Hepatotoxinas			
<u>Peptidos pentacíclicos</u> Nodularina	<i>Nodularia</i>	Inibem o funcionamento das fosfatases I e IIA , causando a morte das células do fígado ou promovendo o carcinoma hepático	Mackintosh <i>et al.</i> , 1990 Nishiwaki-Matsushima <i>et al.</i> ,1992 WHO., 1998; Codd., 2000
<u>Peptidos pentacíclicos</u> Microcistina (LR, RR, YR) Limite máximo aceitável: 1µg/L (águas para consumo humano)	<i>Anabaena</i>	Sintomas: <ul style="list-style-type: none">Hepatoentrite, insuficiência hepática, taquicardia, hepatocarcinogenese, convulsões, gastroenterites, morte	Kuiper-Goodman <i>et al.</i> , 1999
	<i>Microcystis</i>		Carmichael <i>et al.</i> , 2001
	<i>Aphanizomenon</i>		Vasconcelos., 2001
	<i>Nostoc</i>		Briand <i>et al.</i> , 2003
	<i>Hapalosiphon</i>		Ibelings e Chorus., 2007 Funari e Testai., 2008 Decreto-lei 306/2007
Dermatoxina			
<u>Alcalóides</u> <u>Lipopolissacáridos</u>	<i>Oscillatoria</i>	Sintomas: <ul style="list-style-type: none">Hipersensibilidade cutânea, dermatite severa descamação da pele, irritação ocular e do trato respiratório, reacção alérgica, asma, gastroenterites	Kuiper-Goodman <i>et al.</i> , 1999
	<i>Lyngbia</i>		Codd., 2000
	<i>Schizothrix</i>		Vasconcelos., 2001 Briand <i>et al.</i> , 2003 Stewart <i>et al.</i> , 2006

1.2.3 Controlo de CHABs

Nas últimas décadas têm sido desenvolvidas várias técnicas que visam o controlo, remoção ou redução de CHABs. Estas incluem: 1) a aplicação de algicidas sintéticos ou naturais; 2) a circulação artificial da água; 3) a aeração e/ou retirada (exportação) do hipolímnio; 4) a dragagem dos sedimentos; 5) a utilização de ultra-sons; 6) a inactivação do fósforo; 7) a aplicação de agentes coagulantes e; 8) a biomanipulação (Chorus e Mur, 1999; Kim *et al.*, 2008a; Perovich *et al.*, 2008; Pearl *et al.*, 2008). Apesar de relativamente eficazes, o custo e outras limitações decorrentes destas técnicas, particularmente quando estão presentes toxinas, dificultam a sua utilização rotineira (Li e Hu., 2005; Perovich *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2007). Geralmente, opta-se pela aplicação de químicos ou agentes sintéticos, como o sulfato de cobre, os quelatos de cobre, o peróxido de hidrogénio, o permanganato de potássio, o diurão, a atrazina e o paraquato, entre outros (Boyde e Massut, 1999; Hrudet *et al.*, 1999; Schrader *et al.*, 2005; Drábková *et al.* 2007).

A aplicação de sulfato de cobre é praticada desde 1904, permanecendo um tratamento algicida muito utilizado em sistemas dulçaquícolas. Os factores que explicam o sucesso comercial deste produto decorrem da facilidade de aplicação e dos baixos custos associados (Hrudet *et al.*, 1999; Haughey *et al.* 2000; van Hullebusch *et al.* 2003; Schrader *et al.*, 2005). Contudo, a sua eficácia nem sempre é a pretendida verificando-se, em certos casos, a necessidade de aplicar maior dosagem de produto devido à resistência desenvolvida pelos organismos. Por exemplo, a dosagem de sulfato de cobre necessária para combater problemas de odor e cheiro provocados por *Oscillatoria*, num reservatório da Califórnia, aumentou de 27 para 400 toneladas em poucos anos (Chorus e Mur, 1999; Shavyrina *et al.*, 2001; Garcia – Villada *et al.*, 2004; Roussel *et al.*, 2007). Acresce o facto deste composto apresentar um amplo espectro de acção, pelo que a sua aplicação pode afectar igualmente organismos benéficos não alvos, como clorófitas, zooplâncton e peixe (Dethloff *et al.*, 2001; Li e Hu, 2005; Schrader *et al.*, 2005; LeJeune *et al.*, 2006). Adicionalmente, o cobre poderá acumular-se nos sedimentos, podendo persistir durante muito tempo nos sistemas dulçaquícolas, o que afecta os organismos bênticos, entre outros (Haughey *et al.*, 2000; Soldo e Behra, 2000; van Hullebusch *et al.*, 2003). A aplicação de sulfato de cobre pode ainda promover a lise celular induzindo a libertação de cianotoxinas intracelulares que, não sendo removidas pelos métodos de tratamento de água, provocam deterioração da qualidade da água com riscos para os ecossistemas e a saúde pública (Hrudet *et al.*, 1999; Schrader, 2005; Li e Hu, 2005; van Apeldoorn *et al.*, 2007). A intoxicação ocorrida em Palm Island, Austrália (Quadro 1) ilustra a dimensão do problema.

Uma das áreas com maiores potencialidades algicidas consiste no isolamento de compostos inibitórios produzidos por um vasto grupo de organismos que incluem bactérias, fungos, plantas superiores, algas e cianobactérias. Estes metabolitos pertencem a grupos como alcalóides, indóis, fenóis simples e polifenóis, quinonas e análogos, terpenos, derivados de amino ácidos, ácidos gordos saturados e insaturados, entre outros (LeGrande *et al.*, 2003; Schrader *et al.*, 2005; Berry *et al.*, 2008). Para alguns destes metabolitos estão já definidos mecanismos de acção que incluem: 1) inibição do crescimento e mobilidade; 2) lise celular; 3) alterações na fotossíntese e respiração; 4) indução de resposta celular antioxidante enzimática e não enzimática e; 4) modificações na estrutura e permeabilidade das membranas, ocorrendo muitos destes processos em função do stress oxidativo (Quadro 3) (Li e Hu, 2005; Berry *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2008). Além do mais, sendo produtos naturais é de esperar que a sua degradação seja mais rápida causando menos impactos nos sistemas aquáticos (Boyd e Massut., 1999; Schrader *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006). Contudo, alguns destes compostos inibitórios mostraram anteriormente efeitos negativos para espécies que não as alvo, ou para o ambiente, pelo que antes da sua aplicação a situações reais deverão ser elaborados diversos estudos relativamente à estabilidade destes compostos em solução, a sua biodegradação no meio aquático e toxicidade para o biota aquático e homem (Meepagala *et al.*, 2005; Volk e Mundt, 2007; Mizuno *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009)

O indole alcalóide triptamina, é um importante aleloquímico, presente naturalmente em animais e plantas como *Acacia* spp. (Karch, 2008) (Figura 2). São conhecidos os seus efeitos inibitórios no crescimento de *Escherichia coli*, e no desenvolvimento de *Tetrahymena pyriformi*, estando ainda referida a sua influência na atracção insecto – planta, actividade larvar e ovoposição em *Drosophila melanogaster* e *Bemisia tabaci* (Freundlich e Lichstein, 1964; Csaba, 1993; Thomas *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1999). Contudo, o conhecimento dos efeitos tóxicos deste composto em algas e cianobactérias é muito limitado. Num trabalho recentemente desenvolvido, verificou-se que concentrações similares de triptamina previnem o crescimento de estirpes de cianobactérias e microalgas induzindo, contudo, alterações mais significativas na morfologia de cianobactérias, que não conseguem recuperar o crescimento após exposição a este composto (Churro *et al.*, 2007). Hipoteticamente, esta diferente tolerância poderá resultar de uma diferente sensibilidade ao stress oxidativo provocado pela triptamina e, conseqüentemente, deverão existir mecanismos específicos de defesa antioxidante que expliquem as diferenças observadas na morfologia.

Quadro 3 – Compostos naturais com potencial algicida: organismos produtores, principais compostos activos, mecanismos de acção envolvidos e organismo alvo

Organismo Produtor	Composto activo	Efeito	Organismo alvo	Referências
Bactéria				
<i>Bacillus</i> sp.	Bacilamida e análogos	Inibição do crescimento Alterações ultraestruturais e morfológicas	<i>A. catenella</i> <i>A. circinalis</i> <i>A. gracile</i> <i>A. circularis</i> <i>C. polykrikoide</i> <i>G. impudicum</i> , <i>H. akashiwo</i> <i>M. aeruginosa</i>	Jeong <i>et al.</i> , 2003 Socha <i>et al.</i> , 2007 Churro <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus cerus</i>	Não identificado	Líse celular	<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. viridis</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas</i> sp.	β-carbolina	Inibição do crescimento	<i>A. cylindrica</i> , <i>A. variabilis</i> <i>M. aeruginosa</i> , <i>M. viridis</i> <i>O. agardhii</i>	Kodani <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Proteases	Inibição do crescimento Líse celular	<i>C. marina</i> <i>G. catenatum</i> <i>H. akashiwo</i> <i>S. costatum</i>	Lee <i>et al.</i> , 2000 Lovejoy <i>et al.</i> , 1998
<i>γ-proteobacterium</i>	Prodigiosina	Inibição do crescimento	<i>H. akashiwo</i> <i>H. circularisquama</i> <i>C. polykrikoides</i> <i>G. impudicum</i> <i>A. tamarense</i>	Nakashima <i>et al.</i> , 2006 Su <i>et al.</i> , 2007
<i>Micrococcus luteus</i>		Inibição do crescimento e mobilidade	<i>C. polykrikoides</i>	Kim <i>et al.</i> , 2008b
Macrófita				
<i>Myriophyllum spicatum</i>	Taninos Polifenóis Ácidos gordos	Inibição do crescimento, exoenzimas e PSII	<i>M. aeruginosa</i>	Nakai <i>et al.</i> , 2000 Nakai <i>et al.</i> , 2005 Leu <i>et al.</i> , 2002
<i>Vallisneria spiralis</i>	Terpenoide	Inibição do crescimento	<i>M. aeruginosa</i>	Xian <i>et al.</i> , 2006
Fungos				
	L-lisina, Lisina malonato Lisina cobre	Inibição do crescimento, Líse celular	<i>Microcystis</i> spp.	Hehmann <i>et al.</i> , 2002
Algas				
<i>Dictyota dichotoma</i>	Diterpenos	Inibição do crescimento	<i>K. mikimotoi</i> <i>H. akashiwo</i>	Kim <i>et al.</i> , 2006a
<i>Ulva fasciata</i>	Ácidos gordo polinsaturados	Inibição do crescimento	<i>H. akashiwo</i>	Alamsjah <i>et al.</i> , 2005

Quadro 3 – Compostos naturais com potencial algicida: organismos produtores, principais compostos activos, mecanismos de acção envolvidos e organismo alvo (continuação)

Organismo Produtor	Composto activo	Efeito	Organismo alvo	Referências
Plantas				
<i>Callicarpa americana</i>	α -pineno, α -humuleno Epoxido de humuleno II	Inibição do crescimento	<i>O. perornata</i>	Tellez <i>et al.</i> , 2000
<i>Polygonatum odoratum</i> <i>var. pluriflorum</i>	AZC	Inibição do crescimento	<i>M. aeruginosa</i> , <i>A. Affinis</i> <i>C. polykrikoides</i>	Kim <i>et al.</i> , 2006b
<i>Oryza sativa</i>	Esteróides	Inibição do crescimento	<i>M. aeruginosa</i>	Chung <i>et al.</i> , 2007 Park <i>et al.</i> , 2009
<i>Pragmitis communis</i>	EMA	Inibição do crescimento Alterações na micro e ultraestrutura Incremento na produção de EROs Alterações na actividade de sequestração de EROs	<i>M. aeruginosa</i> <i>C. pyrenoidosa</i> , <i>S. capricornutum</i> <i>S. obliquus</i> <i>C. reinhardtii</i>	Li e Hu, 2005 Hong <i>et al.</i> , 2008
<i>Phragmitis australis</i>	EMA	Inibição de crescimento e mobilidade Estímulo crescimento	<i>S. capricornutum</i> <i>S. obliquus</i> <i>C. reinhardtii</i>	Men <i>et al.</i> , 2007
<i>Ruta graveolens</i>	Epoxido de rutacridona	Inibição crescimento	<i>O. perornata</i>	Meepagala <i>et al.</i> , 2005
<i>Juncus acutus</i>	Benzocoumarinos Fenantrenos Fenantrenoides	Inibição de crescimento Estímulo de crescimento	<i>P. subcapitata</i> <i>S. capricornutum</i>	DellaGreca <i>et al.</i> , 2002 DellaGreca <i>et al.</i> , 2002b DellaGreca <i>et al.</i> , 2003
	Estilenos	Inibição do crescimento	<i>O. perornata</i>	Mizuno <i>et al.</i> , 2008
Cianobactérias				
<i>Fischerella sp.</i>	Hapalindole (alcaloide)	Inibição de crescimento e PSII Líse celular	<i>Chlamydomonas</i> sp. <i>M. aeruginosa</i> <i>Synechococcus</i> sp.	Gantar <i>et al.</i> , 2008 Berry <i>et al.</i> , 2008 Etchegaray <i>et al.</i> , 2004
<i>Nodularia harveyana</i> <i>Nostoc insulare</i>	β -carbolina Bifenilo Acetamida	Inibição de crescimento	<i>A. cylindrica</i> , <i>A. constricta</i> <i>A. siamensis</i> , <i>A. laxissima</i> <i>C. minutus</i> , <i>N. carneum</i> , <i>N. insulare</i> , <i>S. aquatilis</i> <i>Synechococcus</i> spp. <i>O. Brevis</i>	Volk, 2005 Volk, 2006 Volk, 2007 Volk e Furket, 2006 Volk e Mundt, 2007
<i>Oscillatoria late-virens</i>	Antibiótico	Inibição crescimento Alterações no teor de proteína e clorofila	<i>M. aeruginosa</i>	Bagchi <i>et al.</i> , 1993

1.2.4 Stress oxidativo em algas e cianobactérias

Os sistemas aquáticos recebem diariamente quantidades consideráveis de metais e compostos xenobióticos, susceptíveis de causar perturbações no ambiente e nas comunidades fitoplânctónicas. A toxicidade destes materiais está relacionada, pelo menos em parte, com o stress oxidativo induzido nos sistemas dulçaquícolas, podendo causar danos oxidativos em organismos aquáticos através do estímulo da produção de espécies reactivas de oxigénio (EROs) (Di Giulio *et al.*, 1995; Livingstone, 2001; Pinto *et al.*, 2003; Knauert e Knauer, 2008).

Embora existam diferentes processos metabólicos responsáveis pela formação de EROs os organismos desenvolveram, durante a sua evolução, um conjunto de mecanismos adaptativos de defesa antioxidante de forma a proteger os seus componentes celulares de danos oxidativos provocados pelas EROs (Livingstone, 2001; Pinto *et al.*, 2003; Halliwell, 2006; Valavanidis *et al.*, 2006). Estes mecanismos são específicos para cada espécie e, inclusivé para cada fenótipo, o que explica que certas espécies de algas e cianobactérias, coexistindo no mesmo habitat, competindo pelos mesmos recursos, possam ter diferentes estratégias para lidar com o stress oxidativo, e consequentemente maior sucesso adaptativo. De uma forma geral as espécies mais tolerantes ao stress possuem mecanismos específicos de sequestração “scavenging” de EROs mais eficientes que espécies menos tolerantes (Choo *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007, Knauert e Knauer, 2008; Mishra *et al.*, 2008). Alternativamente, a excreção de EROs em algas e cianobactérias poderá ser um processo importante de defesa contra o aumento celular das mesmas (Collén e Pedersén, 1996; Choo *et al.*, 2004; Knauert e Knauer, 2008)

Recentemente foi desenvolvido um método fluormétrico (H_2DCFDA), que permite quantificar directamente o stress oxidativo em algas (Knauert e Knauer, 2008). Porém, esta é ainda uma tecnologia pouco utilizada, utilizando-se geralmente métodos indirectos na determinação de stress oxidativo em algas e cianobactérias. Estes métodos consistem na determinação de modificações na actividade do sistema de defesa antioxidante e/ ou na determinação de danos oxidativos, podendo indicar a susceptibilidade de algas e cianobactérias a poluentes específicos (He e Häder, 2002; Mallick, 2004; Srivastava *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2008). Estes parâmetros podem igualmente ser utilizados como bio-indicadores de stress oxidativo, oferecendo critérios que podem ser usados em estudos ecotóxicológicos de diagnóstico, desde que seja determinada a sensibilidade dos mesmos a poluentes específicos (Livingstone, 2001; Dewez *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2007; Valavanidis *et al.*, 2006).

1.2.4.1 Formação de EROs na fotossíntese e respiração

O oxigénio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios sendo utilizada na produção de energia e em inúmeras vias metabólicas fundamentais. Não obstante, o seu consumo gera EROs. As EROs ocorrem naturalmente nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas de organismos aeróbios, em resultado dos processos de respiração e fotossíntese (Dat *et al.*, 2000; Mittler *et al.*, 2004; Scandalios, 2005; Halliwell, 2006). As algas e cianobactérias, organismos aeróbios fotossintéticos, são susceptíveis ao stress oxidativo devido a possuírem pigmentos como clorofila *a* e pigmentos fotossintéticos acessórios, que lhes permitem fotossintetizar sob radiação UV - B, produzindo oxigénio durante a fotossíntese e consumindo o mesmo durante a respiração (He e Häder, 2002; Pinto *et al.*, 2003; Carmichael, 2008; Kumar *et al.*, 2008). Durante estes processos metabólicos, cerca de 2-3% das EROs formadas podem escapar ao sistema de “scavenging” de EROs causando danos oxidativos em componentes celulares (Valavanidis *et al.*, 2006).

Na fosforilação oxidativa, via metabólica responsável pela manutenção do equilíbrio energético dos seres aeróbios, os electrões do NADH e do FADH₂ são transportados ao longo da cadeia transportadora de electrões até o aceitador final O₂, sendo este reduzido a H₂O. Durante a redução do O₂ a H₂O, pode ocorrer a transferência de um, dois ou três electrões para o O₂, formando-se espécies mais reactivas como o superóxido (O₂^{•-}), o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e o radical hidroxilo (OH[•]) (Figura 2) (Dat *et al.*, 2000; Gratão *et al.*, 2005; Scandalios, 2005; Halliwell, 2006).

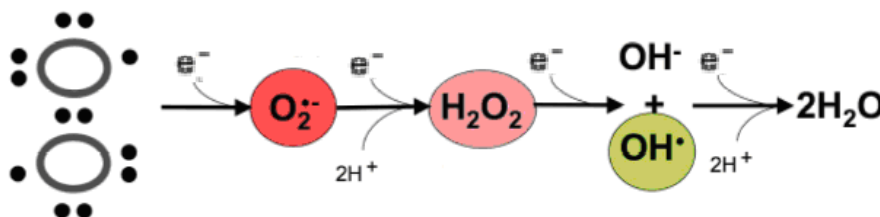


Figura 2 – Distribuição de electrões na orbital externa da molécula de oxigénio e redução desta a água com a formação de EROs na cadeia transportadora de electrões (adaptado de Ferreira *et al.*, 2007)

O O₂^{•-} e o OH[•], em conjunto com *singlete* de oxigénio (¹O₂) são as formas biológicas mais importantes de EROs (Scandalios, 2005). Para além destas espécies, as EROs englobam igualmente os radicais peróxido (RO₂[•]), hidroperóxido (HO₂[•]) e alcóxilo (RO[•]), e não radicais como o ácido hipocloroso (HOCl) e o ozono (O₃) (He e Häder, 2002; Pinto *et al.*, 2003; Scandalios, 2005; Halliwell, 2006).

Em condições fisiológicas normais, o H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\cdot-}$, desempenham funções benéficas nos sistemas biológicos, como sinalizadoras celulares, ou na defesa celular contra agentes microbianos (Vranova *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2003; Scandalios, 2005; Halliwell, 2006).

O $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode ser gerado pela redução do O_2 no fotossistema I (PSI), através da reacção de Mehler, difundindo-se para o estroma onde é dismutado a H_2O_2 e O_2 . Ao contrário do $\text{O}_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 consegue atravessar membranas biológicas e, na presença de metais, pode servir de intermediário para a síntese de espécies mais reactivas como o OH^{\cdot} a partir das reacções de Haber – Weiss e Fenton (Dat *et al.*, 2000; He e Häder, 2002; Mittler, 2002; Halliwell, 2006).

O OH^{\cdot} possui um elevado poder oxidante reagindo com o primeiro substrato disponível, sendo praticamente impossível de sequestrar pelo sistema de defesa antioxidante (Halliwell, 2007). Esta espécie ao retirar um hidrogénio aos ácidos gordos polinsaturados, presentes nas membranas dos tilacóides, inicia peroxidação lipídica que prossegue via reacção em cadeia influenciando a fluidez da membrana celular, bem como a integridade de biomoléculas. O produto final, aldeído malónico (MDA), é utilizado como bio-indicador para determinar a peroxidação lipídica em algas e cianobactérias (He e Häder, 2002; Pinto *et al.*, 2003; Barata *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2008). Estes processos são geralmente lentos mas quando os organismos são expostos a stress por metais e/ou compostos xenobióticos ocorre um aceleração na produção intracelular de EROs o que desencadeia uma resposta metabólica traduzida pelo aumento da sequestração das mesmas (Livingstone, 2001; Pinto *et al.*, 2003; Scandalios, 2005; Valavanidis *et al.*, 2006).

1.2.4.2 Stress oxidativo e dano oxidativo

O incremento de EROs, por um lado, e/ou a ineficiência na sua sequestração pelas defesas antioxidantes, promove uma alteração no balanço entre a produção de EROs e a remoção das mesmas pelas defesas antioxidantes, situação designada stress oxidativo (Halliwell e Whiteman, 2004; Scandalios, 2005; Halliwell, 2007). Esta situação pode potencialmente resultar em dano oxidativo, definido como “dano biomolecular que poderá resultar de um ataque directo das EROs durante o stress oxidativo” (Halliwell e Whiteman, 2004; Halliwell, 2007). Estes danos podem ser severos induzindo alterações consideráveis na conformação de importantes biomoléculas como lípidos de membrana, proteínas, ácidos nucleicos e glúcidos. Uma deficiente capacidade de substituir estas biomoléculas, ou um aumento do stress oxidativo, podem agravar o nível de danos oxidativos o que potencialmente poderá levar à morte celular (Livingstone, 2001; Halliwell e Whiteman, 2004; Pinto *et al.*, 2003; Halliwell, 2006).

1.2.4.3 Formação de EROs por exposição ao cobre

De entre os vários metais, presentes em concentrações elevadas em diversos meios aquáticos, o cobre é uma importante fonte de stress oxidativo, interferindo com o metabolismo de algas e cianobactérias (Livingstone, 2001, Pinto *et al.*, 2003; Mallick e Mohn, 2003; Knauert e Knauer, 2008). O cobre é um micronutriente essencial ao desenvolvimento de organismos fotoautotróficos, como cianobactérias, algas e plantas superiores (van den Hoek *et al.*, 1995; Pinto *et al.*, 2003; Knauert e Knauer, 2008). Tal deve-se, em grande parte, à capacidade deste elemento em converter-se entre o estado reduzido e oxidado, o que lhe permite ser usado como cofactor de diversas enzimas como as oxidases, a SOD, APX e CAT. Adicionalmente, desempenha um papel essencial em alguns dos componentes da cadeia transportadora de electrões, nomeadamente a plastocianina do fotossistema I (PSI) (Pinto *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2004; Knauert e Knauer, 2008; Bhargava *et al.*, 2008). Contudo, em concentrações excessivas este elemento torna-se tóxico para a comunidade fitoplânctónica. A toxicidade e a biodisponibilidade estão dependentes da especiação do metal e das relativas interações deste com os diferentes ligandos presentes em solução e/ou na superfície de partículas e organismos (Di Toro *et al.*, 2001; Dewez *et al.*, 2005; Cuppette *et al.*, 2006). Vários estudos indicam que os efeitos biológicos deste composto estão relacionados com a concentração de Cu^{2+} , sendo esta forma juntamente com $\text{Cu}^{2+}(\text{H}_2\text{O})$, e $\text{Cu}(\text{OH})^+$, as mais tóxicas para os organismos aquáticos (Sunda e Guillard 1976; Andrade, 2004; Cuppette *et al.*, 2006).

A toxicidade do cobre para algas e cianobactérias não está relacionada com um único modo de acção, na verdade ela interfere com vários aspectos do metabolismo incluindo: 1) o crescimento (Mallick *et al.*, 1990; Dewez *et al.*, 2005; Parales-Vela, 2007); 2) a síntese de pigmentos, fotossíntese e respiração (Rai *et al.*, 1996; Mallick e Mohn, 2003; Dewez *et al.*, 2005; Parales-Vela, 2007); 3) a integridade de proteínas, membranas lipídicas (Nagalashimi e Prasad, 1998; Tesseire e Guy, 2000; Srivastava *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006) e; 4) a actividade enzimática, em particular a actividade de sequestração de EROS (Mallick *et al.*, 2004; Dewez *et al.*, 2005; Srivastava *et al.*, 2006; Bhargava *et al.*, 2008). Um dos efeitos mais importantes do cobre no metabolismo de organismos fototróficos relaciona-se com a inibição da fotossíntese (Mallick e Mohn, 2003; Dewez *et al.*, 2005; Bhargava *et al.*, 2008; Knauert e Knauer, 2008). Os efeitos tóxicos do cobre em algas e cianobactérias indicam estar fortemente relacionados com a produção de EROs. Contudo, o papel destas na toxicidade do cobre é um assunto controverso (Nagalashimi e Prasad, 1998; Ratkevicius *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 2006; Knauert e Knauer, 2008).

Para compreender melhor o papel das EROs na toxicidade do Cu^{2+} para as algas, Knauert e Knauer (2008) expuseram *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, a 250 nM de Cu^{2+} tendo verificado uma inibição da actividade fotossintética de 12% em *Pseudokirchneriella subcapitata*, mas não em *Chlorella vulgaris*. Tal parece indicar que estas espécies deverão ter diferentes mecanismos de resposta ao stress induzido pelo cobre (Knauert e Knauer, 2008). Posteriormente, aplicaram um agente de sequestração de EROs, tendo obtido uma diminuição na produção de EROs até níveis semelhantes aos do controlo e uma restauração completa da actividade fotossintética. Estes resultados parecem indicar que a produção de EROs é o agente causal da toxicidade do cobre para as células algais, contrariando a opinião corrente de que os danos oxidativos são meramente uma consequência da toxicidade do cobre e que a directa interacção deste elemento com componentes do PSII é responsável pela interrupção do transporte de electrões (Knauert e Knauer, 2008).

Embora as EROs sejam muito reactivas, os organismos desenvolveram ao longo da sua evolução diversos mecanismos de desintoxicação responsáveis pelo controlo celular das mesmas, assegurando a manutenção da homeostasia redox, fundamental para a sobrevivência dos seres aeróbios (Livingstone, 2001; Pinto *et al.*, 2003; Halliwell, 2006; Valavanidis *et al.*, 2006). Por exemplo, a defesa antioxidante funciona como um sistema equilibrado e coordenado, permitindo manter em equilíbrio EROs. Este balanço, juntamente com a sequestração de iões metálicos, é muito importante para evitar a formação de espécies muito reactivas, como o OH^\bullet , a partir das reacções de Haber – Weiss e Fenton (Figura 3) (Dat *et al.*, 2000; He e Häder, 2002; Mittler, 2004; Halliwell, 2006).

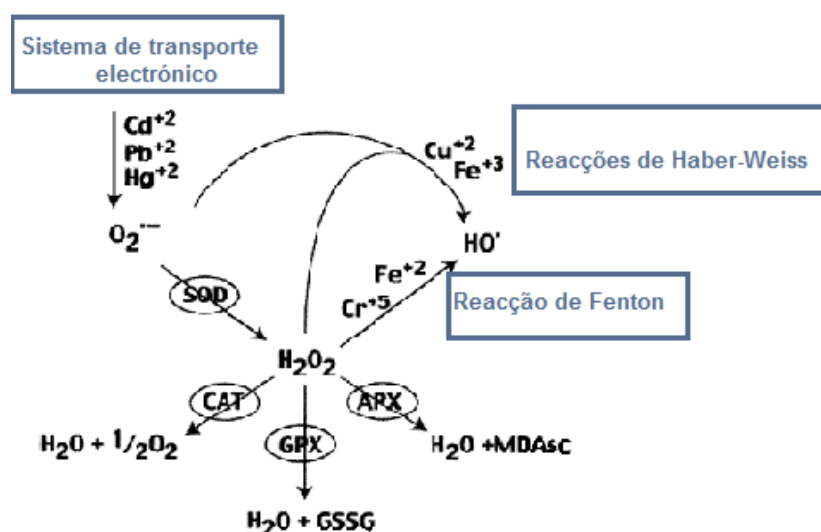


Figura 3 – Formação celular de EROs em organismos após exposição ao stress induzido por metais (adaptado de Pinto *et al.*, 2003)

1.2.4.4 Resposta antioxidante enzimática e não-enzimática

Nas últimas décadas foram desenvolvidos diversos trabalhos que mostram que a exposição de algas e cianobactérias a diversos stresses abióticos provoca alterações nos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, e em certos casos danos oxidativos (Quadro 4) (Figura 4) (Mallik, 2004; Srivastava *et al.*, 2006; Kumat *et al.*, 2008, Hong *et al.*, 2008). Nestes organismos as moléculas envolvidas na resposta anti-enzimática englobam o ascorbato (ASA), a glutathiona (GSH) e os carotenóides (CAR). Estes compostos desempenham um papel relevante na remoção de EROs, em particular OH^\cdot , ($^1\text{O}_2$), $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 (Livingstone, 2001; Pinto *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2008). De entre os diversos antioxidantes, destacam-se a superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), a catalase (CAT; EC 1.11.1.6), a ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) e a glutathiona redutase (GR; EC 1.6.4.2) (Mallik, 2004; Srivastava *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2008).

A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as EROs sendo responsável pela dismutação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 (Scandalios, 2005; Pinto *et al.*, 2003, Gratão *et al.*, 2005; Halliwell, 2006). Em algas e cianobactérias podem estar presentes quatro tipos de isoenzimas de SOD, sendo estas classificadas de acordo com o cofactor metálico (Fe, Mn, CuZn, e Ni). A isoenzima FeSOD parece estar associada com o PSI inactivando o $\text{O}_2^{\cdot-}$ gerado na reacção de Mehler (Wolf – Simon *et al.*, 2005). A CAT, APX e GR são consideradas essenciais na sequestração do H_2O_2 , dismutando-o e formando H_2O e O_2 (Livingstone, 2001; Pinto *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2008). Contudo, a activação deste sistema é complexa, já que estas enzimas estão localizadas em compartimentos celulares diferentes. A CAT encontra-se maioritariamente nos peroxissomas, enquanto a APX e GR podem estar presentes no citosol, mitocôndria e nos cloroplastos (Mittler *et al.*, 2004; Shigeoka *et al.*, 2002; Choo *et al.*, 2004; Dewez *et al.*, 2005). A CAT e APX possuem diferentes afinidades em relação ao substrato. A CAT possui uma menor afinidade com o H_2O_2 (mM) agindo na remoção do excesso de EROs durante o stress, enquanto a APX, com maior afinidade em relação ao substrato (μM), poderá ser responsável por uma fina modelação da resposta em relação às EROs (He e Häder, 2000; Mittler, 2002).

Um outro mecanismo de sequestração de H_2O_2 é o ciclo do ascorbato – glutathiona, no qual o ascorbato, a glutathiona e NADPH são sucessivamente oxidados e reduzidos pela APX, GR, e desidroascorbato-redutase (DHAR, EC.1.8.5.1) e monodesidroascorbato-redutase (MDHAR, EC.1.6.5.4) (Pinto *et al.*, 2003; Mittler *et al.*, 2004; Gratão *et al.*, 2005).

Quadro 4 – Alterações no sistema antioxidante enzimático de microalgas e cianobactérias após exposição a stresses abióticos

Organismo testado	Stress	Efeito na actividade relativamente ao controlo	Referências
Catalase			
Reacção: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$			
<i>Anabaena doliolum</i>	10, 20, 30 e 40 $\mu\text{M Cu}^{2+}$ 50 $\mu\text{M Cu}^{2+}$ 22 minutos UV – B 50 minutos UV – B 10 $\mu\text{M Cu}^{2+}$ + 22 minutos UV – B 50 $\mu\text{M Cu}^{2+}$ + 50 minutos UV – B 200 mM NaCl 150 mM NaCl + 50 minutos UV – B 250 mM NaCl + 50 minutos UV – B 48 °C + 22 minutos UV – B 58 °C + 50 minutos UV – B	Incremento Decréscimo Inibição de 45% Inibição de 20% Inibição de 40% Inibição de 80% Elevada inibição Inibição de 70% Inibição de 20% Incremento 7,0 Decréscimo 2,5	Mishra <i>et al.</i> , 2008 Srivastava <i>et al.</i> , 2005 Srivastava <i>et al.</i> , 2006
<i>Scenedesmus obliquus</i>	3 mg L ⁻¹ Cu ²⁺	Incremento de 80 %	Dewez <i>et al.</i> , 2005
<i>Microcystis aeruginosa</i>	(4 – 8) mg L ⁻¹ gramina (indole alcalóide)	Incremento significativo	Hong <i>et al.</i> , 2009
<i>Microcystis aeruginosa</i>	1mg L ⁻¹ EMA + (0 - 60 horas) >1mg L ⁻¹ EMA + (0 - 60 horas)	Incremento Decréscimo	Hong <i>et al.</i> , 2008
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Ligeiro incremento	Mallick, 2004
<i>Pavlova viridi</i>	3mg L ⁻¹ Cu ²⁺	Incremento 285,74 %	Li <i>et al.</i> , 2006
<i>Scenedesmus bijugatus</i>	100 $\mu\text{M Cu}^{2+}$	Incremento 35 %	Nagalakshmi e Prasad., 1998
APX			
Reacção: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Ascorbato} \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Mono-dehidro-ascorbato}$			
<i>Anabaena doliolum</i>	40 $\mu\text{M Cu}^{2+}$ 250 mM NaCl 10 $\mu\text{M Cu}^{2+}$ + 150 mM NaCl 50 $\mu\text{M Cu}^{2+}$ + 250 mM NaCl 22 minutos UV – B 50 minutos UV – B 150 mM NaCl + 22 minutos UV – B 250 mM NaCl + 50 minutos UV – B	Incremento Incremento Incremento 8,8 Incremento 2,7 Incremento 7,6 Incremento 8,2 Incremento 11,4 Incremento 8,4	Srivastava <i>et al.</i> , 2005 Srivastava <i>et al.</i> , 2006
<i>Scenedesmus obliquus</i>	3 mg L ⁻¹ Cu ²⁺ 24h	Incremento de 25 %	Dewez <i>et al.</i> , 2005
<i>E. ahlneriana</i>	15 C ⁹ + 6 horas	Incremento significativo	Choo <i>et al.</i> , 2004
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Ligeiro incremento	Mallick, 2004
<i>Scenedesmus bijugatus</i>	100 $\mu\text{M Cu}^{2+}$	Incremento 63 %	Nagalakshmi e Prasad, 1998

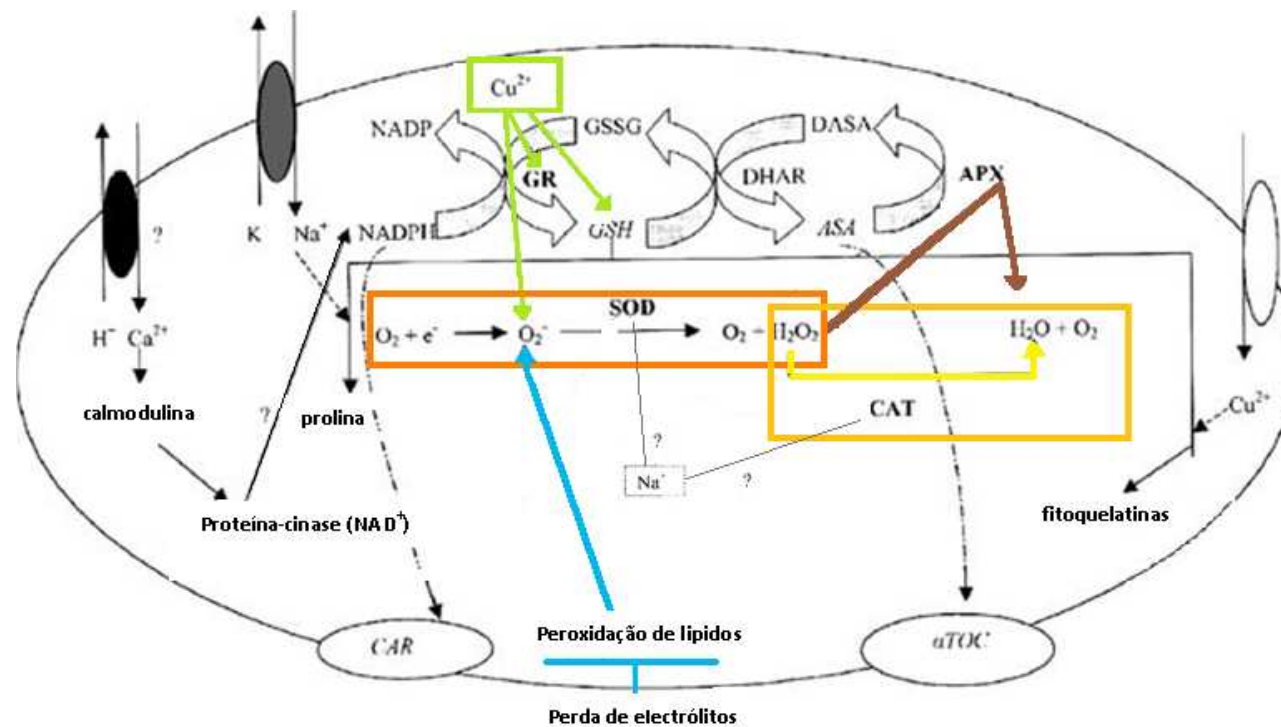


Figura 4 – Modelo hipotético da indução de resposta antioxidante enzimática e não enzimática em *Anabaena doliolum* exposta a stress salino e por Cu^{2+} . “?” Significa que apesar de se verificarem efeitos não se conhecem as razões (adaptado de Srivastava *et al.*, 2005)

2. OBJECTIVOS

2.1. Objectivo Geral

Neste trabalho expusemos três espécies, *Ankistrodesmus falcatus* (clorófita), *Anabaena* sp. e *Aphanizomenon gracile* (cianobactérias formadoras de blooms), a condições de stress oxidativo pela aplicação de sulfato de cobre e triptamina e, através da medida de indicadores de stress oxidativo, avaliamos a diferente tolerância destes organismos ao stress e a eficácia dos mecanismos específicos de defesa antioxidante. Foi ainda avaliado o efeito do sulfato de cobre no crescimento de *Anabaena* sp. e *Ankistrodesmus falcatus*.

2.2. Objectivos específicos:

- 2.2.1. Avaliar o efeito do Cu^{2+} no crescimento de *Anabaena* sp. e *Ankistrodesmus falcatus* expondo estas culturas a diferentes concentrações de Cu^{2+} (1 a 10 μM e 2,5 a 20 μM , respectivamente).
- 2.2.2. Optimização de metodologias de extracção da fracção protéica e medição da actividade enzimática da CAT e da APX para microalgas e cianobactérias.
- 2.2.3. Avaliar a resposta antioxidante enzimática (CAT e APX) e a produção de MDA e H_2O_2 de estirpes de *Ankistrodesmus falcatus* e *Aphanizomenon gracile* expostas a tratamentos com diferentes concentrações de triptamina, (0, 3 e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$), após 24 horas de exposição.
- 2.2.4. Avaliar a resposta antioxidante enzimática (CAT e APX) e a produção de MDA de estirpes *Ankistrodesmus falcatus* e *Anabaena* sp. expostas a tratamentos com diferentes concentrações de cobre (0 μM , 10 μM , 50 μM) e (0 μM , 1 μM , 5 μM), e a diferentes tempos de exposição (24 e 48 horas e 24 horas, respectivamente).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Localização dos ensaios e determinações analíticas

Os ensaios experimentais para obtenção dos materiais biológicos a estudar foram realizados numa câmara de culturas existente no Departamento de Saúde Ambiental – Laboratório de Microbiologia e Ecotoxicologia (LME) do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge. Esta câmara é constituída por um conjunto de sistemas que englobam: ar condicionado, arejadores e um painel de lâmpadas fluorescentes ligadas a um temporizador, permitindo deste modo controlar a temperatura, o nível de oxigenação e o fotoperíodo. As determinações analíticas foram realizadas nos Laboratórios do Departamento de Química Agrícola e Ambiental (DQAA) do Instituto Superior de Agronomia.

3.2. Materiais biológicos utilizados nos ensaios

3.2.1. Obtenção e manutenção das estirpes

Para a realização deste trabalho utilizaram-se culturas unialgais pertencentes à colecção de culturas de microalgas Estela Sousa e Silva situada no LME do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. As culturas stock estão alojadas numa câmara de culturas aclimatizada com fotoperíodo de 16: 8 horas (luz: escuro) com uma intensidade luminosa de $36 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a uma temperatura de $20 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e são mantidas em frascos de cultura de 20 mL contendo meio Z_8 (Skulberg e Skulberg, 1990), cuja composição se encontra no anexo I. A informação relativa a cada estirpe encontra-se detalhada no Quadro 5. As estirpes ensaiadas pertencem a classes taxonómicas distintas, pretendendo reproduzir alguma diversidade fitoplânctónica, em particular relativamente aos mecanismos de defesa antioxidante.

Quadro 5 – Informação relativa às estirpes utilizadas nos ensaios (adaptado de Churro *et al.*, 2008)

Classe	Ordem	Espécie	Estirpe	Local/Data colheita
Chlorophyceae	Chlorococcales	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	LMECHL003	a
Cyanophyceae	Nostocales	<i>Aphanizomenon gracile</i>	LMECY40	Reservatório do Crato, Portalegre, Portugal, 1996
Cyanophyceae	Nostocales	<i>Anabaena</i> sp.	LMECY182	Rio Guadiana, Vitonogales, Espanha, 1999

a – Cultura gentilmente cedida por V. Vasconcelos (CIIMAR – Universidade do Porto, Portugal)

3.2.2. Cultivo das estirpes nos reactores luminosos de plâncton

A Figura 6. esquematiza de forma simplificada a metodologia adoptada no cultivo das culturas ensaiadas nos reactores luminosos de plâncton. Para cada estirpe colocou-se 20 mL de cultura stock a crescer num reactor luminoso de plâncton Aqua Medic GmbH™, previamente esterilizado, contendo 2000 mL meio Z₈. Durante duas semanas monitorizou-se o crescimento das culturas tendo-se retirado, no dia anterior ao inicio dos ensaios, uma alíquota de cada reactor de plâncton para contagem do número de células. Posteriormente, transferiu-se um dado volume deste reactor (Figura 6) para três novos reactores, previamente esterilizados, e adicionou-se a estes meio Z₈ até perfazer 2000 mL. As culturas foram mantidas nas mesmas condições referidas no ponto 3.2.1. sob aeração constante. Todos os ensaios foram realizados na fase exponencial de crescimento das estirpes.

3.3. Compostos utilizados nos ensaios

Nos ensaios efectuados foi utilizado sulfato de cobre penta-hidratado e triptamina Merck™ (Figura 5.) com um grau de pureza de 99 %. A solução stock de sulfato de cobre foi obtida diluindo 237,6 mg do composto em 500 mL de meio Z₈ (concentração final 475,2 µg mL⁻¹). A solução stock de triptamina foi obtida diluindo 200 mg do composto em 1000 mL de meio Z₈ (concentração final 200 µg mL⁻¹). As soluções stock foram mantidas a 4 °C, numa câmara refrigerada e colocadas à temperatura ambiente antes do seu uso.

A escolha das concentrações a utilizar nestes ensaios baseou-se na determinação de concentrações inibitórias de crescimento ($IC_{50_{192 \text{ horas}}}$) (Churro *et al*, 2008).

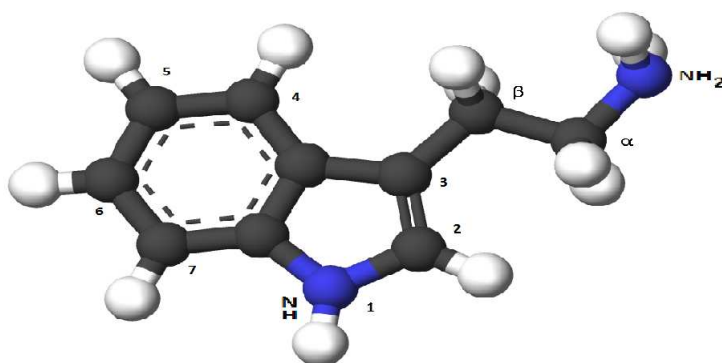


Figura 5 – Estrutura indólica da triptamina (adaptado de <http://en.wikipedia.org/wiki/Tryptamine>)

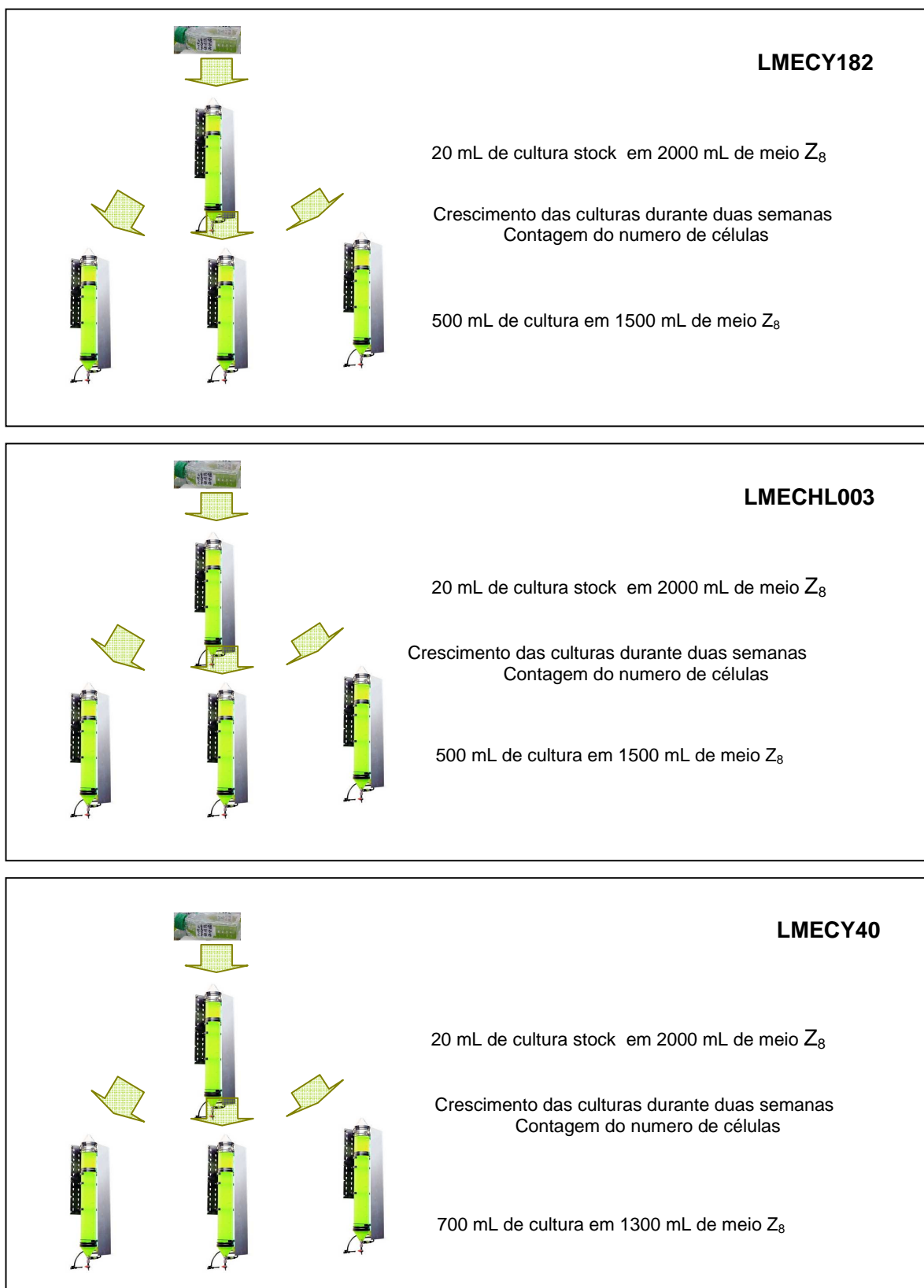


Figura 6 – Esquema do cultivo das estirpes ensaiadas nos reactores luminosos de fitoplâncton (adaptado de <http://www.aqua-medic.de/seawater/en/16/plancton%20light%20reactor/>)

3.4. Determinação de indicadores de stress oxidativo

3.4.1. Esquema dos ensaios

A parte experimental foi conduzida em dois ensaios independentes, tendo sido avaliadas 18 modalidades, num total de 78 amostras (Quadro 6).

No dia da instalação dos ensaios (Tempo de exposição de 0 horas) foram adicionados 30 mL da solução stock de triptamina aos reactores de fitoplâncton C, G e 60 mL aos reactores D, H (Figura 7). Relativamente ao ensaio do cobre, adicionou-se 1 mL da solução stock de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) aos reactores de fitoplâncton L, 5 mL ao M, 10 mL ao P, e 50 mL ao Q (Figura 8).

Quadro 6 – Esquema dos dois ensaios realizados e respectivas modalidades

	<i>Tempo (horas)</i>	<i>Volume (mL)</i>	<i>Modalidade</i>
Concentração de Triptamina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
<u>Estirpe LMECY40</u>			
0	0	140	A
	24	140	B
3	24	140	C
6	24	140	D
<u>Estirpe LMECHL003</u>			
0	0	140	E
	24	140	F
3	24	140	G
6	24	140	H
Concentração de Cobre (μM)			
<u>Estirpe LMECY182</u>			
0	0	140	I
	24	140	J
1	24	140	L
5	24	140	M
<u>Estirpe LMECHL003</u>			
0	0	140	N
	24	140	O
10	24	140	P
	48	140	Q
50	24	140	R
	48	140	S

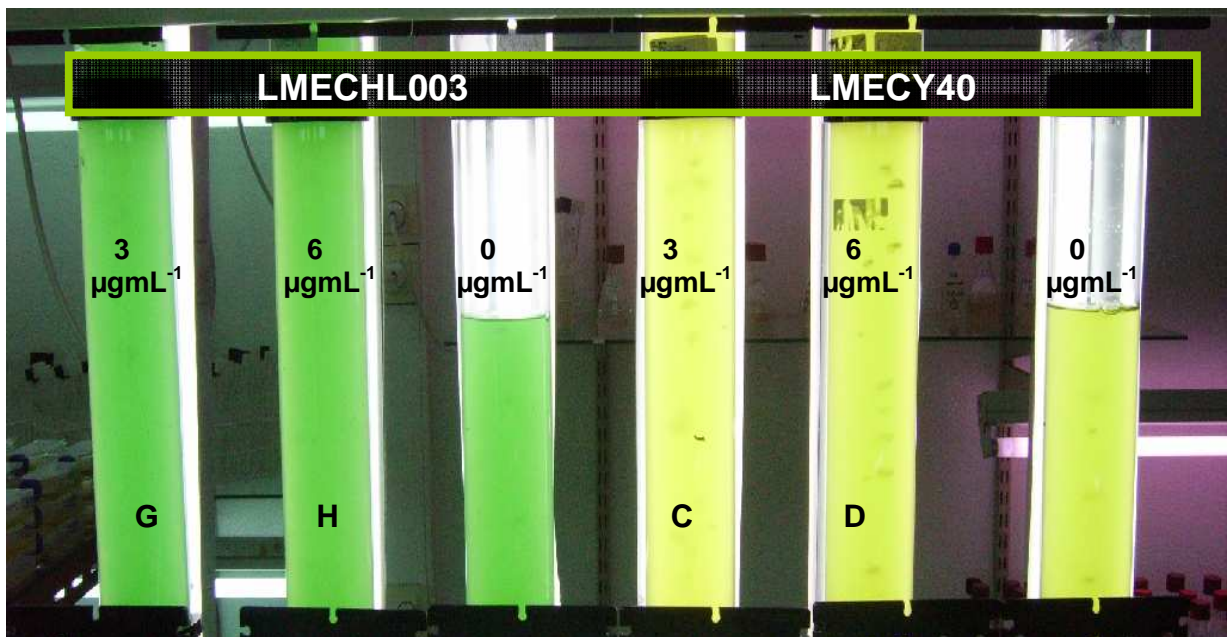


Figura 7 – Reactores luminosos de fitoplâncton correspondentes ao delineamento experimental relativo ao ensaio da triptamina: tempo exposição de 0 horas

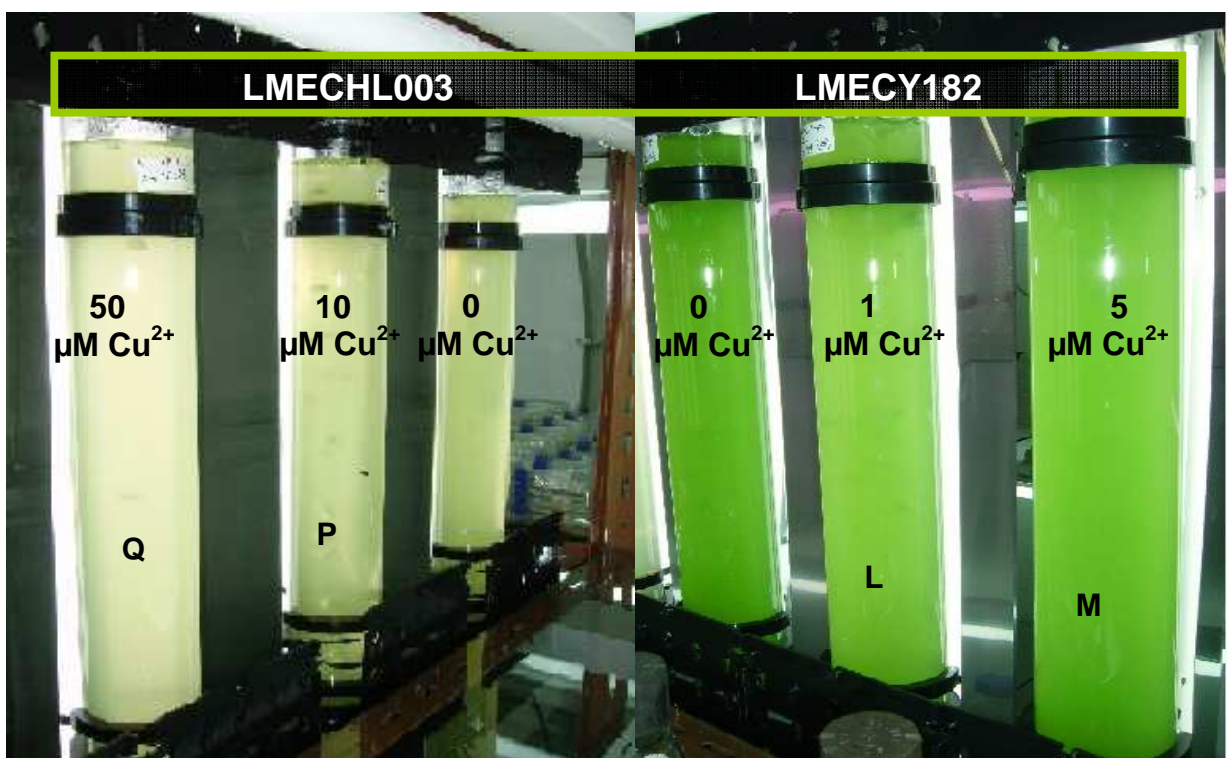


Figura 8 – Reactores luminosos de fitoplâncton correspondentes ao delineamento experimental relativo ao ensaio do sulfato de cobre: tempo exposição de 0 horas

3.4.2. Determinação da actividade de antioxidantes enzimáticos

Todas as determinações efectuadas foram realizadas utilizando amostras obtidas em triplicado e repetidas duas vezes de forma a garantir a reprodutibilidade dos resultados. As leituras de actividade enzimática das diversas enzimas testadas foram efectuadas num espectrofótopmetro com registador computadorizado Hitachi U – 2000 UV/Vis SpectrophotometerTM, obtidas por um método contínuo com intervalos de 10 segundos, para os comprimentos de onda adequados. Todas as determinações de actividade enzimática foram efectuadas à temperatura ambiente do laboratório. A actividade enzimática foi expressa em actividade específica, ou seja, actividade enzimática em relação ao teor de proteína da amostra.

3.4.2.1 Catalase (CAT)

As leituras de actividade enzimática foram efectuadas, a um comprimento de onda de 240 nm, utilizando-se cuvetes de quartzo, iniciando-se logo após se efectuar a preparação do meio reaccional constituído por 10 mM de H₂O₂ em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,6) e 200 µL extracto enzimático da amostra, num volume total de 2,7 mL, num procedimento experimental adaptado de Aebi (1983). O decréscimo na absorvância devido à decomposição do H₂O₂ foi monitorizado e registado durante um período de 2 minutos e é proporcional à quantidade de enzima presente. Uma unidade de actividade enzimática é definida pela quantidade de enzima necessária para catalisar a decomposição de 1 µmol min⁻¹ mL⁻¹ (U mL⁻¹) de H₂O₂, a 25 °C, utilizando um coeficiente de absorvidade molar do H₂O₂ a 240 nm, $\epsilon = 3,94 \times 10^{-3}$ mL µmol⁻¹ mm⁻¹ (Aebi, 1983).

3.4.2.2 Ascorbato Peroxidase (APX)

As leituras da actividade enzimática da ascorbato-peroxidase foram efectuadas, a um comprimento de onda de 290 nm, logo após se adicionar às cuvetes de quartzo, 2,95 mL de meio de reacção constituído de 0,25 mM de ascorbato e 0,1 mM EDTA, 0,3 mM H₂O₂ em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,6) e 50 µL do sobrenadante da amostra. De acordo com Ali *et al.*, (2005) o decréscimo gradual na absorvância, devido à degradação do ascorbato, foi monitorizado durante 2 minutos e é proporcional à quantidade de enzima presente. Uma unidade de actividade enzimática é definida pela quantidade de enzima que catalisa decomposição de 1 µmol min⁻¹ mL⁻¹ (U mL⁻¹) de ascorbato, a 25 °C, utilizando um coeficiente de absorvidade molar do ascorbato de 0,26 mL µmol⁻¹ mm⁻¹ (Aravind e Prasad, 2004).

3.4.3 Quantificação da Proteína Total

Para a determinação da actividade enzimática (CAT, APX) em relação à quantidade de proteína solúvel das amostras (actividade específica) foi necessário proceder à quantificação da proteína total das amostras. Durante a realização dos ensaios reservou-se para esse fim 200 µL do sobrenadante utilizado para a determinação da actividade enzimática das amostras. A quantificação da proteína total foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), que se baseia na ligação do corante azul de Coomassie BG-250 com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. A cada 25 µL de amostra, adicionou-se 75 µL de Tampão Fosfato (TF) e 3 mL de reagente de Bradford ("Coomassie brilliant blue" BG-250) tendo-se posteriormente homogeneizado a solução no vortex. Após 5 minutos à temperatura ambiente, foram realizadas leituras de absorvância ($\lambda = 595$ nm). O ensaio em branco consistiu 75 µL de Tampão Fosfato (TF) e 3 mL de reagente de Bradford ("Coomassie brilliant blue" BG-250). Foi utilizada uma curva padrão obtida com soluções de albumina de soro bovino (BSA) em diferentes concentrações (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0). De acordo com a correlação obtida, a concentração de proteína (mg mL^{-1}) pode ser obtida através da equação: $x = (y - 0,017) / 0,636$, $R^2 = 0,9896$, sendo y a absorvância da amostra a 595 nm.

3.4.4 Determinação do Peróxido de Hidrogénio

Para cada 1,5 mL de amostra, foram adicionados 5 mL de 0,1% (p/v) TCA. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 12 000 x g, durante 15 minutos em centrífuga refrigerada Sigma-3-18kTM. De seguida, retirou-se uma alíquota de 500 µL de sobrenadante para um tubo de vidro e adicionou-se 500 µL de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) 10 mM e 1 mL de iodeto de potássio. O ensaio em branco consistiu na adição de 5 mL de 0,1% (p/v) TCA a 500 µL de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) 10 mM e 1 mL de KI. Após este processo os tubos foram homogeneizados num vortex. As leituras foram efectuadas num espectrofótopmetro com registador computadorizado Hitachi U – 2000 UV/Vis SpectrophotometerTM a 395 nm (Singh *et al.* 2006). Foi utilizada uma curva padrão, com uma gama de concentrações de peróxido de hidrogénio entre 0 e 5 mg mL^{-1} . De acordo com a correlação obtida, a concentração de peróxido de hidrogénio (mg mL^{-1}) pode ser obtida através da equação: $x = (y + 0,0004) / 0,0846$, $R^2 = 0,9966$, sendo y a absorvância da amostra a 395 nm.

3.4.5 Determinação da Peroxidação Lipídica

Este método foi determinado medindo a formação de MDA pelo método do ácido tiobarbitúrico (Madhava Rao e Sresty, 2000), com algumas modificações. A cada 2 mL de amostra adicionou-se 2,5 mL de 0,1 % (p/v) TCA como agente extractante e centrifugou-se a 10 000 x g, durante 15 minutos em centrífuga refrigerada Sigma-3-18kTM. Em seguida, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi recolhida para um tubo de vidro e adicionada a 4 mL de 0,5 % (p/v) TBA em TCA a 20 % (p/v). Os tubos foram incubados em água a 95 °C, durante 30 minutos. Após este período, a reacção foi interrompida por arrefecimento imediato em banho de gelo, procedendo-se depois a uma centrifugação a 10 000 x g, durante 15 minutos. Após este passo agitaram-se os tubos num vortex. As leituras foram efectuadas num espectrofótopmetro com registador computadorizado Hitachi U – 2000 UV/Vis SpectrophotometerTM a 532 nm descontando-se a absorvância inespecífica a 600 nm. A concentração de MDA (mM) foi calculada, utilizando-se o coeficiente de absorvidade 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Demiral e Türkan, 2005), de acordo com a expressão:

$$[\text{MDA}] \text{ (mM)} = \frac{\text{Abs } 532 - \text{Abs } 600}{155,10}$$

3.5 Efeito do cobre no crescimento das estirpes

Os efeitos do cobre no crescimento de *Ankistrodesmus falcatus* e *Anabaena* sp., foram avaliados utilizando uma metodologia semelhante à descrita em Churro *et al.* (2008).

Estirpes de *Ankistrodesmus falcatus* e *Anabaena* sp., foram inoculadas em microplacas de 96 pocetos, sendo expostas a concentrações de cobre entre 2,5 a 20 µM e 1 a 10 µM, respectivamente. Posteriormente foram incubadas na câmara de culturas, nas mesmas condições descritas em 3.2.1, durante um período de 192 horas. Durante este período mediu-se diariamente a absorvância (450 nm) nos pocetos utilizando um leitor de microplacas Thermo LabsystemsTM. Para cada concentração, bem como para os controlos, foram calculados a média e desvio padrão dos triplicados que permitiram determinar o crescimento das culturas.

As concentrações inibitórias de crescimento IC₅₀_{192 horas}, foram calculadas por regressão das curvas de inibição de crescimento através de análise de probits.

3.6 Tratamento estatístico

Para determinar o efeito dos diferentes tratamentos de triptamina e sulfato de cobre nas células das estirpes ensaiadas, aplicou-se aos resultados obtidos uma análise de variância a um factor (ANOVA). Para a determinação da IC50_{192 horas} foi utilizada uma análise de regressão não ponderada (Probit). Foi usado o software SPSS 13,0 (SPSS inc) e o teste de Tukey para comparação das médias, para um nível de significância de 5%.

4. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRACÇÃO

4.1. Considerações gerais

O presente capítulo teve como objectivo a descrição do procedimento seguido para estabelecer uma metodologia de extracção da fracção protéica e medição da actividade enzimática da CAT e da APX. Os ensaios efectuados visaram avaliar as condições de extracção mais adequadas durante as diversas etapas deste processo. Foram avaliadas as seguintes etapas: recolha de células, ruptura celular, composição do tampão de extracção, centrifugação e sequência analítica a utilizar. Durante estes ensaios preliminares foram utilizadas as mesmas estirpes e condições de cultivo definidas em materiais e métodos. O estabelecimento desta metodologia permitiu obter as condições experimentais definidas em material e métodos que foram utilizadas neste trabalho.

Para as determinações de antioxidantes enzimáticos são determinantes condições de obtenção de extractos estáveis, em que os níveis de actividade enzimática reproduzam os teores celulares *in vivo*. Apesar de algumas variações que envolvem um conjunto de parâmetros como a temperatura, o pH do tampão, a presença de substâncias interferentes, a concentração de substrato e, as condições de centrifugação, o princípio do método de extracção é comum a diversos materiais biológicos. Existiam disponíveis no laboratório métodos otimizados para determinação da actividade da CAT e APX em material de vegetal. Porém, ao utilizar como material biológico cianobactérias e microalgas verificou-se que estas metodologias não eram as mais adequadas a reproduzir os teores celulares *in vivo*. Consequentemente, tornou-se essencial pesquisa bibliográfica relativa a este tipo de material biológico. Contudo, a maioria dos trabalhos disponíveis utilizam outros grupos taxonómicos e/ou metodologias que requerem equipamento, reagentes, ou logística muito específica. Consequentemente, para o desenvolvimento destes ensaios foram feitas alterações nas condições de extracção partindo de diversas metodologias existentes e referidas na bibliografia, de forma a possibilitar a realização destas determinações analíticas com os materiais biológicos e as condições laboratoriais disponíveis.

As condições de extracção estabelecidas permitiram obtenção de um extracto final parcialmente purificado que continha a proteína em formas solúveis, com estabilidade adequada à determinação da actividade enzimática de CAT e APX. Em todos os passos efectuados, foram tomados diversos cuidados de forma a manter a temperatura das amostras na ordem dos 4 °C.

4.2. Condições de extracção

4.2.1. Recolha de células

Vários autores referem a centrifugação como método de recolha de células de microalgas e cianobactérias do meio de cultura (Dewez *et al.* 2006; Hong *et al.*, 2008; Mishra *et al.* 2005; Srivastava *et al.*, 2006). No caso da recolha de células referente ao ponto 3.4.1 retirou-se, para cada modalidade (Quadro 6), 140 mL de cultura para quatro tubos de centrifuga. De seguida efectuou-se uma centrifugação 9600 x g, durante 15 minutos a 8 °C, em centrífuga refrigerada Beckman Coulter™ J2 – 21 M/E. O “pellet” obtido foi suspenso novamente em 3 mL de uma solução 100 mM Tris – HCl (pH 7), 20 % glicerol, procedendo-se posteriormente a um rápido congelamento em azoto líquido. As amostras foram conservadas na arca de congelação a uma temperatura de -65 °C até a continuidade dos protocolos específicos. O posterior descongelamento das amostras ocorreu à temperatura ambiente durante cerca de 15 minutos.

4.2.2. Ruptura Celular

A escolha do método de extracção a utilizar teve em consideração a presença de membranas e parede celular no material biológico a analisar. A análise de enzimas intracelulares, como a CAT e APX, por métodos espectrofotométricos está dependente de ruptura celular prévia.

No processo de libertação de enzimas, particularmente intracelulares, a parede celular representa uma barreira na transferência destas moléculas para o exterior das células. A utilização de ultra-sons, é um método que se tem mostrado adequado na obtenção de enzimas e proteínas intracelulares, sem contudo inativá-las (Mokkila *et al.*, 2004). O recurso a esta técnica é referido em diversos trabalhos envolvendo cianobactérias e microalgas. Porém, o efeito da aplicação de ultra-sons na actividade e estabilidade de enzimas varia consoante a estirpe e enzima a testar, estando sempre dependente dos parâmetros de sonicação adoptados (Mishra *et al.* 2008; Srivastava *et al.*, 2006; Hong *et al.* 2008). Por exemplo, para obtenção de extractos adequados à determinação da actividade enzimática da CAT e APX em *Anabaena doliolum*, Mishra *et al.* (2008) efectuaram uma sonicação a 10 kHz durante 10 minutos com quatro intervalos de 2 minutos cada. Por sua vez, Hong *et al.* (2008) utilizaram ondas de potência igual a 200 W durante um período de 5 minutos (pulsos de 2 segundos, 8 segundos de pausa) em *Microcystis aeruginosa*. Dado o homogeneizador ultrasónico disponível para os ensaios (Dr. Hielscher GmbH™ UP 50 H Ultrasonic) possuir uma potência máxima de 50 W, o presente ponto tem como objectivo adequar as condições de sonicação aos materiais biológicos a analisar.

Apresenta-se de seguida uma descrição do procedimento utilizado para este efeito: 2 mL de amostra foram suspensos em 3 mL de tampão de extracção apropriado (ver ponto 4.2.3), e seguidamente submetidos a uma sonicação num recipiente de esferovite contendo gelo, de forma a manter a temperatura em torno dos 4 °C. Optou-se por fixar potência em 50 W (pulsos de 6 segundos, 4 segundos de pausa), e variou-se o tempo de sonicação (0, 10, 15, 20 minutos). Em seguida observou-se, num microscópio óptico Leitz Dialux 22TM, amostras retiradas a cada um dos tempos de exposição. As amostras de *Anabaena sp.* e *A. gracile* correspondentes ao controlo apresentavam a morfologia típica, sendo bem visíveis heterocistos e células agrupadas em colónias (filamentos). Com o aumento dos tempos de sonicação foram sendo verificados sinais de alterações morfológicas. De uma forma geral, para tempos de sonicação iguais ou superiores a 10 minutos, as células apresentavam-se deformadas, com filamentos mais curtos e em certos casos quebrados. Consequentemente, a parede celular encontrava-se danificada, promovendo a libertação de pigmentos e outros metabolitos para o exterior das estruturas celulares. Este facto era visível pela aparente descoloração das células das estirpes ensaiadas.

De forma a avaliar se a ruptura celular tinha sido suficiente para libertar as enzimas CAT e APX, sem contudo inactivá-las, foram determinadas actividades enzimáticas para as modalidades de sonicação que produziram maior rompimento celular. Contrariamente ao que se esperava, as actividades enzimáticas obtidas foram baixas. Tentou-se equacionar as causas para tal dado que à partida os metabolitos intracelulares, em particular as enzimas, estavam disponíveis, como comprovava a observação microscópica. Uma possível causa poderia se dever a desnaturação devida a um sobre-aquecimento da amostra resultante de um arrefecimento pouco eficiente. Aliás, Almeida *et al.* (2008) refere como um dos inconvenientes do método de ultra-sons o excessivo aquecimento da amostra. De facto, a garantia da manutenção de baixas temperaturas para preservação da actividade biológica da enzima poderia não estar a ser satisfeita, dado que era incompatível com o tempo durante o qual o aparelho necessitava estar ligado até se atingir o grau de ruptura pretendido. Para solucionar este problema foi necessário verificar a temperatura da amostra durante o processo de sonicação substituindo, sempre que necessário, o gelo. Adicionalmente, procedeu-se a um leve agitação dos tubos para que durante este processo todas as células presentes na amostra experimentassem a mais elevada energia de cisalhamento (Almeida *et al.* 2008). Esta acção resolveu um problema decorrente da deformação dos tubos de plástico que impossibilitava a sua reutilização, que poderia, inclusivé, dificultar contacto entre as ondas produzidas e as células da amostra.

Após se proceder a estas alterações na metodologia, foram medidas actividades enzimáticas da CAT e APX e, com bases nestas, estabeleceram-se as seguintes condições de sonicação: potência 50 W, durante um período de 20 minutos (pulsos de 6 segundos, 4 segundos de pausa) a 4°C.

4.2.3. Composição do tampão de extracção

Dada a necessidade de os extractos obtidos se manterem estáveis durante os ensaios houve a necessidade de efectuar pesquisa sobre a composição dos tampões de extracção, permitindo que alterações que ocorressem ao longo do tempo fossem minoradas. Alguns autores referem a utilização de tampão fosfato em organismos como *Anabaena variabilis*, *Nostoc muscorum* e *Aulosira fertilissima*, *Cladophora glomerata*, *Enteromorpha ahlnneriana* (Choo *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2008). Por outro lado, Srivastava *et al.* (2006) e Mishra *et al.* (2008) utilizaram em ensaios para determinação da actividade enzimática da CAT e APX em *Anabaena doliolum* um tampão de extracção composto por 1 mM EDTA e 1 % PVP, com a adição de 1 mM de ASA no caso da APX. Contudo, verificou-se, para as amostras testadas nestes ensaios, que estes tampões não asseguravam a estabilidade enzimática necessária, tendo-se equacionado a utilização de um tampão de extracção Tris – HCl, como referido em Nagalashimi e Prasad (1998) e em Bhargava *et al.* (2008). Relativamente à CAT testou-se o tampão de extracção descrito em seguida: (1) Tris-HCl, 100 mM (pH 7, 5), 3 mM de DTT (p/v), 1 mM de EDTA (p/v). Porém, está referenciada a utilização de tampões de extracção com pH compreendido entre 7,0 e 7,5 em materiais biológicos semelhantes aos utilizados nestes ensaios (Dewez *et al.* 2006; Hong *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008). Para avaliar a potencial influência do pH, foram medidas as actividades enzimáticas de um tampão com a mesma composição mas com pH corrigido a 7,0. Os valores de actividade enzimática obtidos foram ligeiramente melhores, permanecendo no entanto baixos e pouco estáveis. Partindo da hipótese de que a baixa actividade se pudesse dever a problemas decorrentes de oxidação de polifenóis presentes nos extractos enzimáticos, testou-se a adição de PVP (Soares *et al.* 2002). Porém, a adição de PVP dificultou o processo de sonicação e, não se tendo registado uma melhoria na actividade enzimática que justificasse a adição deste composto, optou-se por efectuar a extracção sem este composto. Foi então testada a utilização de um protector da fracção protéica, o glicerol, numa tentativa de melhorar a estabilidade enzimática, tendo sido adicionado ao tampão de extracção, 20 % de glicerol (p/v), tendo-se obtido uma melhoria da estabilidade enzimática. Para a APX foi testado um tampão com uma composição semelhante ao estabelecido para CAT mas com adição de 5 mM de ASA e 10 % de glicerol tendo-se verificado ser adequado.

Foram estabelecidos tampões de extracção com a seguinte composição:

- 1) para CAT: Tris-HCl, 100 mM (pH 7,0), 3 mM de DTT (p/v), 1 mM de EDTA (p/v) e 20 % glicerol
- 2) para APX: Tris-HCl, 100 mM (pH 7,0), 3 mM de DTT (p/v), 1 mM de EDTA (p/v), 5 mM de ASA (p/v) e 10 % glicerol.

4.2.4. Remoção dos resíduos celulares por centrifugação

Neste passo pretendeu-se a obtenção de um extracto límpido de forma a não afectar as leituras de absorvância. Hong *et al.* (2008) efectuou uma centrifugação 12 000 x *g*, durante 10 min, a 4 °C para *Microcystis aeruginosa*. Centrifugações mais fortes, 15 000 x *g*, durante 30 minutos, a 4 °C, encontram-se descritas em Mishra *et al.* (2008) e Srivastava *et al.* (2006) para *Anabaena doliolum*. Experimentou-se inicialmente uma centrifugação 12000 x *g*, durante 20 minutos, a 4 °C, em centrífuga refrigerada Sigma-3-18kTM. Porém, ao verificar que o extracto não se apresentava límpido, optou-se por uma centrifugação 12000 x *g*, durante 30 minutos, a 4 °C. Observaram-se melhorias consideráveis no extracto, e consequentemente na actividade enzimática da CAT e APX, estabelecendo-se as seguintes condições de centrifugação: 12000 x *g*, durante 30 minutos, a 4 °C.

4.2.5. Concentração de substrato a utilizar nas leituras

A utilização de concentrações de substrato inadequadas pode impedir a obtenção de resultados fiáveis de actividade enzimática. De forma a testar os volumes de amostra mais adequados à determinação da actividade enzimática da CAT e APX foram realizados ensaios com diversas modalidades (1 a 6) (Quadros 7 e 8). EB refere-se ao ensaio em branco. Para cada modalidade foram determinadas actividades enzimáticas e comparados os resultados. Com base nestes ensaios estabeleceram-se as seguintes concentrações de extracto:

- 1) para CAT: 1,5 mL de solução tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,6), 1 mL de solução stock H₂O₂ e 200 µL do sobrenadante da amostra.
- 2) para APX: 1,90 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,6), 750 µL de uma solução stock de 0,25 mM Ascorbato e 0,1 mM EDTA, 300 µL de uma solução stock de 0,30 H₂O₂ e 50 µL de sobrenadante da amostra.

Quadro 7 – Esquema de leituras para determinação da actividade enzimática da CAT

	<i>EB</i>	1	<i>EB</i>	2	<i>EB</i>	3
Tampão (mL)	2,5	1,5	2,6	1,6	2,65	1,65
Amostra (μL)	200	200	100	100	50	50
H₂O₂ (mL)	1	1	1
V total (mL)	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7

Quadro 8 – Esquema de leituras para determinação da actividade enzimática da APX

	<i>EB</i>	4	<i>EB</i>	5	<i>EB</i>	6
Ascorbato + EDTA (μL)	750	750	750	750	750	750
Tampão (mL)	2,3	1,9	2,3	1,85	2,3	1,8
Amostra (μL)		50		100		150
H₂O₂ (μL)		300		300		300
V total (mL)	3	3	3	3	3	3

4.2.6. Sequência analítica de preparação de extractos

Após o estabelecimento das condições mais adequadas em cada etapa do processo de extracção, foram ensaiadas três modalidades (A, B, C). A Figura 9. ilustra a sequência de etapas utilizadas para cada metodologia. Estão representadas as etapas que se seguem ao descongelamento da amostra.

No caso da modalidade A, e para cada enzima a testar (CAT, APX), suspendeu-se 1 mL de amostra em 1,5 mL de tampão de extracção adequado (ver ponto 4.2.3). De seguida efectuou-se uma centrifugação $3\,000 \times g$, durante 15 minutos, a 4 °C em centrífuga refrigerada Sigma-3-18k™. O “pellet” foi recolhido para tubos de plástico e suspenso novamente em 3 mL de tampão extracção adequado (ver ponto 4.2.3) e procedeu-se ao processo de sonicação (ver ponto 4.2.2). De seguida, retirou-se uma alíquota de 1,7 mL de cada tubo e efectuou-se uma centrifugação (ver 4.2.4). Posteriormente, retirou-se uma alíquota de 1,5 mL do sobrenadante para tubos “eppendorf” e procedeu-se às leituras de actividade enzimática (ver ponto 4.2.5). Dado que a primeira centrifugação se destinava a retirar as células do meio de cultura inicial, avaliou-se a eficácia deste procedimento, eliminando-a do procedimento e medindo a actividade enzimática (modalidade B). A actividade enzimática obtida não mostrou melhorias, e os valores de actividade enzimática eram muito baixos, indicando que a preparação do extracto não estava a ser adequada. Além disso, nestas modalidades, a obtenção dos triplicados de cada amostra era efectuada antes da sonicação, requerendo tempos totais de sonicação consideráveis o que tornava a logística laboratorial complicada, o que foi determinante para se testar uma modalidade diferente, a modalidade C. Para a modalidade C, para cada amostra e enzima a testar (CAT, APX), tomaram-se 2 mL de amostra, suspendeu-se em 3 mL de tampão de extracção apropriado (ver ponto 4.2.3), e procedeu-se a uma sonicação (ver ponto 4.2.2). Após este processo, retiraram-se 3 alíquota de 1,7 mL de cada tubo de cada tubo e efectuou-se uma centrifugação (ver 4.2.4) para remover materiais celulares (Choo *et al.*, 2004). Posteriormente, retirou-se uma alíquota de 1,5 mL do sobrenadante para tubos “eppendorf” e procederam-se às leituras de actividade enzimática (ver ponto 4.2.5).

A modalidade de extracção C mostrou ser a mais eficiente na obtenção de um extracto final parcialmente purificado, contendo proteína em formas solúveis, com estabilidade compatível com as determinações de actividade enzimática. Consequentemente, esta modalidade foi adoptada como metodologia de extracção mais adequada sendo utilizada na determinação da actividade enzimática dos ensaios referidos em materiais e métodos.

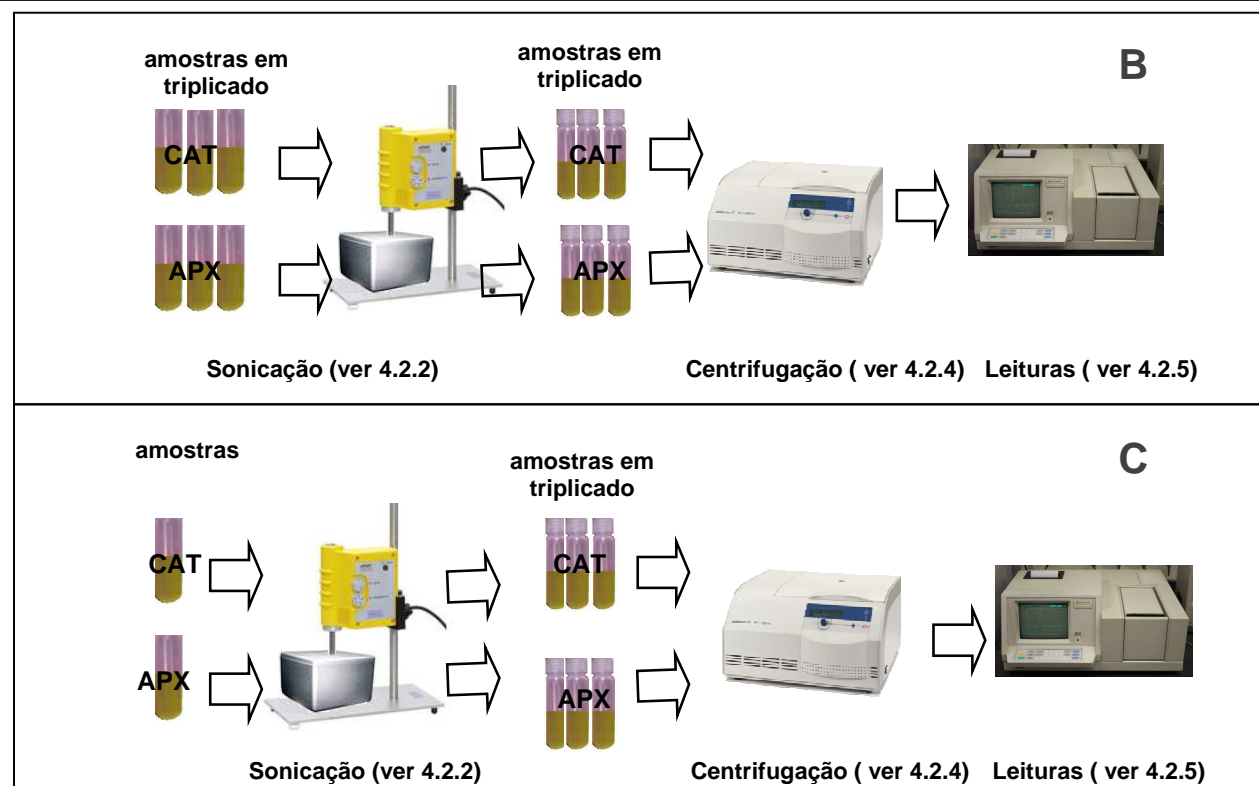
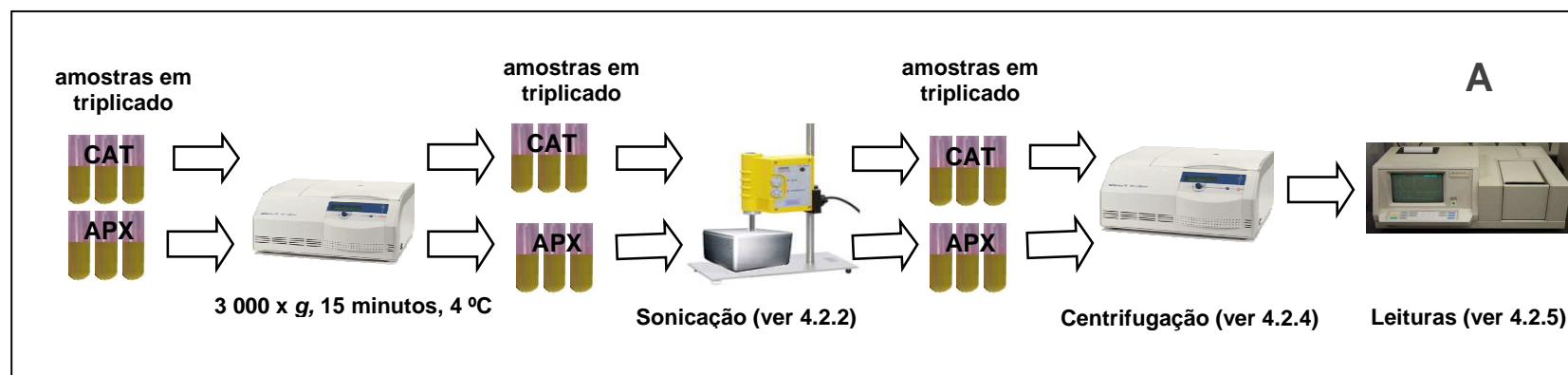


Figura 9 – Sequências analíticas testadas na preparação dos extractos

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio relativo à triptamina

A utilização de compostos aleloquímicos com potencial algicida pode provocar stress oxidativo em algas e cianobacterias (Schrader *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009). De uma forma geral o stress oxidativo deriva de uma alteração no balanço entre a produção de EROs e a remoção das mesmas pelas defesas antioxidantes e o desequilíbrio estabelecido favorece o aumento de EROs (Halliwell e Whiteman, 2004; Scandalios, 2005; Halliwell, 2007). Em células algais uma EROs predominantemente mensurável é o H_2O_2 , dado que esta espécie é relativamente estável e menos reactiva que o $\text{O}_2^{\cdot -}$ e o OH^{\cdot} (Knaut e Knauer, 2008). Apesar de H_2O_2 poder, em excesso, causar danos oxidativos em membranas, lípidos e ácidos nucleicos, os organismos aquáticos desenvolveram, durante a sua evolução, um conjunto de mecanismos adaptativos de defesa antioxidante de forma a proteger os seus componentes celulares de danos oxidativos provocados pelas EROs (Livingstone, 2001; Pinto *et al.*, 2003; Halliwell, 2006).

Neste ensaio expusemos duas espécies, *Ankistrodesmus falcatus* e *Aphanizomenon gracile*, a condições de stress oxidativo pela aplicação de 3 e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptamina e, através da medida de indicadores de stress oxidativo, avaliamos a diferente tolerância destes organismos ao stress e a eficácia dos mecanismos específicos de defesa antioxidante.

5.1.1. Danos oxidativos induzidos pela triptamina

A Figura 10. refere-se a danos oxidativos produzidos em *Ankistrodesmus falcatus* e *Aphanizomenon gracile*, resultantes de stress oxidativo induzido por diferentes concentrações de triptamina (0, 3 e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Estes danos foram medidos em termos do conteúdo de H_2O_2 e peroxidação lipídica utilizando como indicador o produto final MDA.

Em situações fisiológicas normais (0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptamina) verificou-se uma baixa produção de H_2O_2 em *A. gracile* e *A. falcatus*, devendo esta resultar do metabolismo normal destes organismos (Livingstone, 2001; He e Häder, 2002; Pinto *et al.*, 2003; Knaut e Knauer, 2008). Porém, foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos conteúdos celulares de H_2O_2 e MDA entre as duas estirpes. *A. gracile* apresentou uma menor produção (28,25 %) de H_2O_2 , que se repercutiu numa menor produção (30,09 %) de MDA relativamente a *A. falcatus*. Este tipo de diferenças são característicos de um organismo específico, pelo que podem ocorrer diferenças entre diferentes espécies de cianobactérias, algas, ou até entre diferentes fenótipos da mesma espécie (Choo *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008).

Neste ensaio, após a aplicação de um stress abiótico (3 e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptamina) verificou-se um incremento significativo ($p < 0,05$) na produção de EROs, neste caso de H_2O_2 , em *A. gracile* e *A. falcatus*, o que parece indicar que as células estariam em stress oxidativo. Estes resultados estão em consonância com os obtidos expondo *Microcystis aeruginosa* a EMA e gramina dois aleloquímicos com potencialidades para serem utilizados como agentes algicidas (Hong *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009). Foram ainda registadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na produção de H_2O_2 entre as duas estirpes. O H_2O_2 é uma ERO que pode causar danos de natureza oxidativa, podendo induzir alterações consideráveis na conformação de importantes biomoléculas como lípidos de membrana e proteínas. Por outro lado, durante a evolução, *A. gracile* e *A. falcatus*, coexistindo no mesmo habitat, competindo pelos mesmos recursos, poderão ter desenvolvido diferentes estratégias para sequestrar o H_2O_2 , o que explica uma maior ou menor tolerância destes organismos ao stress oxidativo induzido pela triptamina. Assim, estirpes que possuam mecanismos mais eficientes de sequestração de H_2O_2 deverão sofrer menores danos oxidativo, sendo de esperar que os parâmetros bioquímicos H_2O_2 e MDA, variem na razão inversa.

Em *A. falcatus*, o desequilíbrio gerado no estado redox celular, não foi acompanhado de um incremento no conteúdo de MDA, que é utilizado como bioindicador da peroxidação lipídica reflectindo assim o grau de dano oxidativo celular (He e Häder, 2002; Pinto *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009). De facto, apesar de se ter registado uma correlação positiva ($r = 0,99$) entre o aumento na produção de H_2O_2 e o aumento da concentração de triptamina até 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram verificados decréscimos de 16,15 % e 33,76 % nos níveis de MDA, tendo-se estabelecido uma correlação negativa ($r = 0,99$) entre aumento da concentração de triptamina e o nível de MDA formado. Por outro lado, em *A. gracile* verificaram-se os maiores aumentos significativos ($p < 0,05$) nos níveis de H_2O_2 (4,0 e 1,62) e MDA (1,62 e 1,49) relativamente ao controlo e, para concentrações de 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptamina, o conteúdo de celular de H_2O_2 foi significativamente ($p < 0,05$) mais acentuado (39,38 %) que em *A. falcatus*, ocorrendo um decréscimo não significativo para concentrações de 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os danos membranares produzidos nesta estirpe mostraram estar correlacionados positivamente ($r = 0,99$) com a produção de H_2O_2 .

Hipoteticamente a menor fitotoxicidade da triptamina, verificada *A. falcatus* relativamente a *A. gracile*, poderá dever-se a menores danos oxidativos produzidos nos lípidos membranares desta estirpe sugerindo que *A. falcatus* possua eficientes mecanismos de defesa antioxidante que lhe permitam uma maior tolerância ao stress oxidativo.

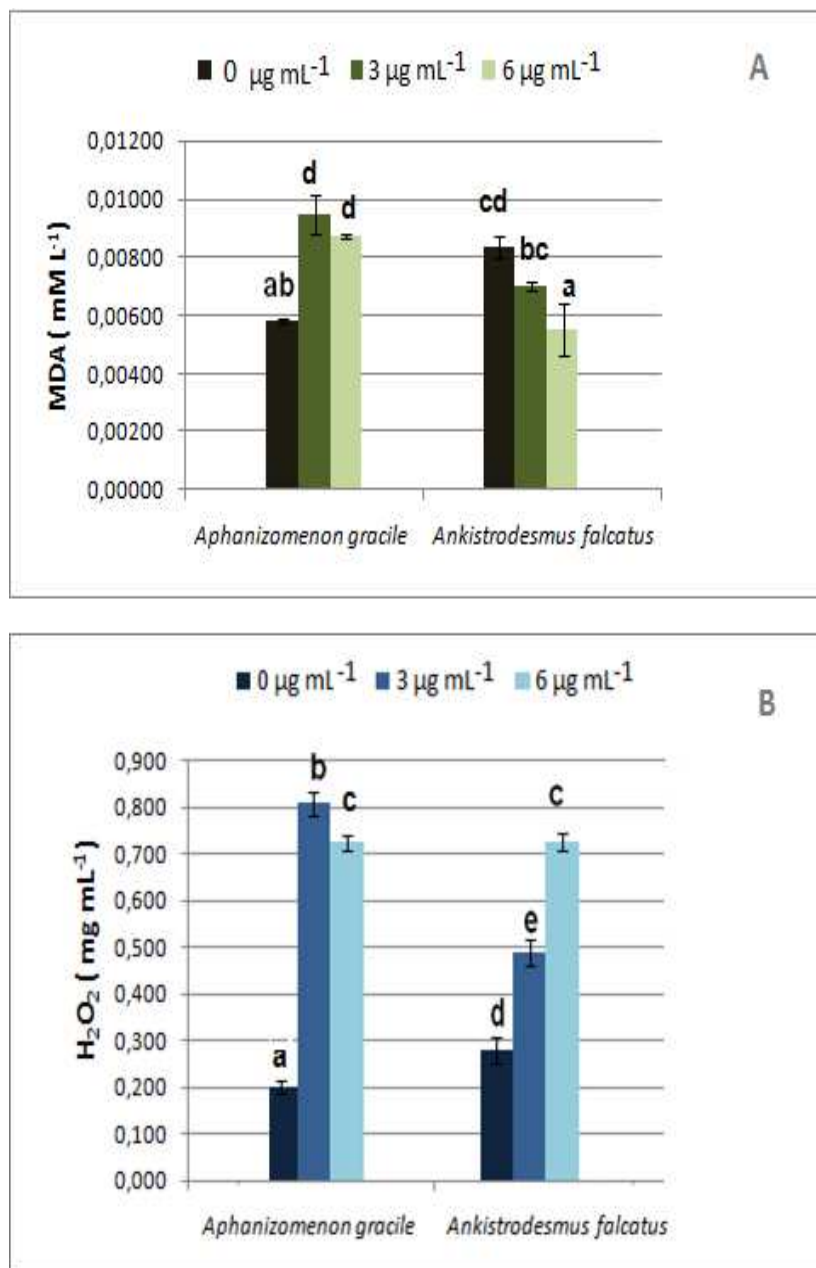


Figura 10 – Peroxidação lipídica (A) e nível de H₂O₂ (B) em *A. gracile* e *A. falcatus* expostas a diferentes concentrações de triptamina. A peroxidação lipídica foi medida através da produção de MDA. As barras representam as médias ± desvio padrão dos triplicados. Diferentes letras, presentes em cima das barras, denotam significância intra ou interespecífica p < 0,05

De forma a averiguar se o aumento na produção de EROs verificado em *A. gracile* e *A. falcatus*, pela exposição a triptamina, estimulou a activação do sistema de defesa antioxidante enzimático, foram avaliadas as actividades da CAT e APX.

5.1.2. Efeitos da triptamina na actividade enzimática

A Figura 11. refere-se a variações no teor de proteína e na actividade enzimática de CAT e APX em *Ankistrodesmus falcatus* e *Aphanizomenon gracile*, resultantes de stress oxidativo induzido por diferentes concentrações de triptamina (0, 3 e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A actividade enzimática foi expressa em actividade específica, ou seja, actividade enzimática em relação ao teor de proteína da amostra.

Neste ensaio, verificou-se que a exposição a triptamina provocou um aumento do nível celular de EROs, tendo o sistema de defesa antioxidante respondido significativamente ($p < 0,05$) à indução deste sinal destrutivo. Contudo, a indução da actividade da CAT e APX não foi suficiente para evitar a ocorrência de danos proteicos. Relativamente ao teor em proteína total foram verificados decréscimos significativos com o aumento da concentração de triptamina, 13,94 % e 21,77 % em *A. gracile* e 6,52% e 21,47 % *A. falcatus*, em relação aos controlos. Estes decréscimos no conteúdo protéico poderão resultar de um aumento de EROs, cujo efeito pode ser o resultado de uma degradação da fracção protéica, resultante de danos de natureza oxidativa (Leitão *et al.*, 2003; Møller e Kristensen, 2004).

A maior actividade de CAT e APX verificada em *A. falcatus* (0,10; 0,09; 0,10 e 1,51; 2,41 respectivamente) relativamente a *A. gracile*, sugere que os mecanismos de defesa antioxidante de *A. falcatus*, estejam mais fortemente expressos, em particular a APX. De facto, a actividade da CAT e APX, são características de cada organismo, e tendo sido desenvolvidas durante a evolução dos mesmos podem estar diferentemente expressas, o que pode, em parte, conferir uma maior ou menor tolerância ao stress oxidativo (Choo *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007; Knaut e Knauer, 2008; Mishra *et al.*, 2008). Estes resultados são similares aos obtidos em *Ulva rígida* e *Cladophora glomerata*, nos quais a APX mostrou ser a enzima principal na sequestração de H_2O_2 (Collén e Pedersén, 1996; Choo *et al.*, 2004). Possíveis explicações para a maior actividade de APX relativamente a CAT, registada para concentrações de 3 e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptamina, poderão estar relacionadas com o facto de a CAT possuir uma menor afinidade com o substrato (H_2O_2) (mM) agindo na remoção do excesso de EROs durante o stress, enquanto a APX, com maior afinidade em relação ao substrato (μM), poderá ser responsável por uma fina modelação da resposta em relação à produção de EROs (He e Häder, 2000; Mittler, 2002). Assim, o aumento significativo de H_2O_2 , verificado em *A. gracile* após a exposição a 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptamina, deverá ter actuado como um sinal para o operão *apx*, responsável pela regulação desta enzima, o que explica que para 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptamina esta espécie possua uma maior actividade da APX ($p < 0, 05$) (42,7 %) relativamente a *A. falcatus* (Vranova *et al.*, 2002).

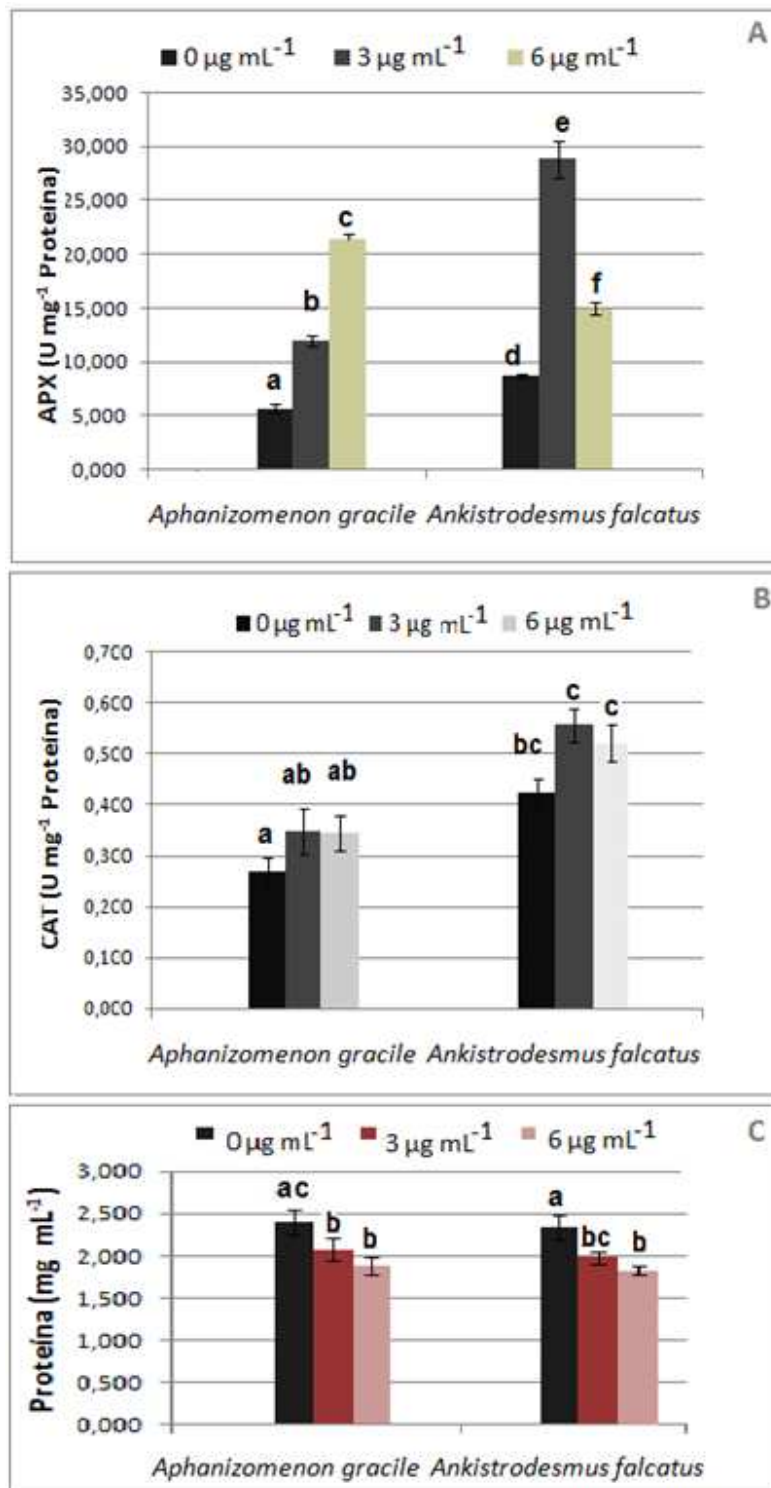


Figura 11 – Efeito de diferentes concentrações de triptamina na actividade de APX (A) e CAT (B) e proteína total (C) em *A. gracile* e *A. falcatus*. As barras representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados. Diferentes letras, presentes em cima das barras, denotam significância intra ou interespecífica $p < 0,05$

5.2. Ensaio relativo ao cobre

5.2.1. Efeitos do Cu^{2+} no crescimento

O cobre é um micronutriente essencial ao metabolismo de microalgas e cianobactérias, contudo, a diferença entre a concentração nutricional necessária ao crescimento óptimo e aquela que provoca efeitos tóxicos é por vezes reduzida (Tesseire e Guy, 2000; Pinto *et al.*, 2003; Knauert e Knauer, 2008; Dewez *et al.*, 2005).

Analisando a Figura 12, é possível verificar que os controlos de *A. falcatus* (B) e *Anabaena* sp. (A) se adaptaram bem às condições de crescimento nas microplacas, tendo a fase exponencial se iniciado cerca das 24 horas e mantido até as 192 horas. Contudo, para concentrações de 8 e 10 μM de Cu^{2+} , o crescimento de *Anabaena* sp. foi acentuadamente afectado (inibição de 86,4 % e 88, 5% quando comparado com o controlo), enquanto o crescimento de *A. falcatus* foi pouco afectado, mesmo para as maiores concentrações testadas 15 e 20 μM de Cu^{2+} (inibição de 21,7% e 51,7% quando comparado com o controlo). De facto, calculando as concentrações inibitórias ($\text{IC}_{50_{192 \text{ horas}}}$), é possível concluir que as concentrações necessárias para inibir 50% do crescimento de *A. falcatus* ($\text{IC}_{50_{192 \text{ horas}}} = 17 \mu\text{M}$) são mais altas que as necessárias para inibir 50% do crescimento de *Anabaena* sp. ($\text{IC}_{50_{192 \text{ horas}}} = 6,62 \mu\text{M}$). Com base nestes resultados podemos concluir que para as mesmas concentrações de Cu^{2+} , estas duas espécies apresentam uma diferente sensibilidade à exposição ao Cu^{2+} , sendo *A. falcatus* mais tolerante.

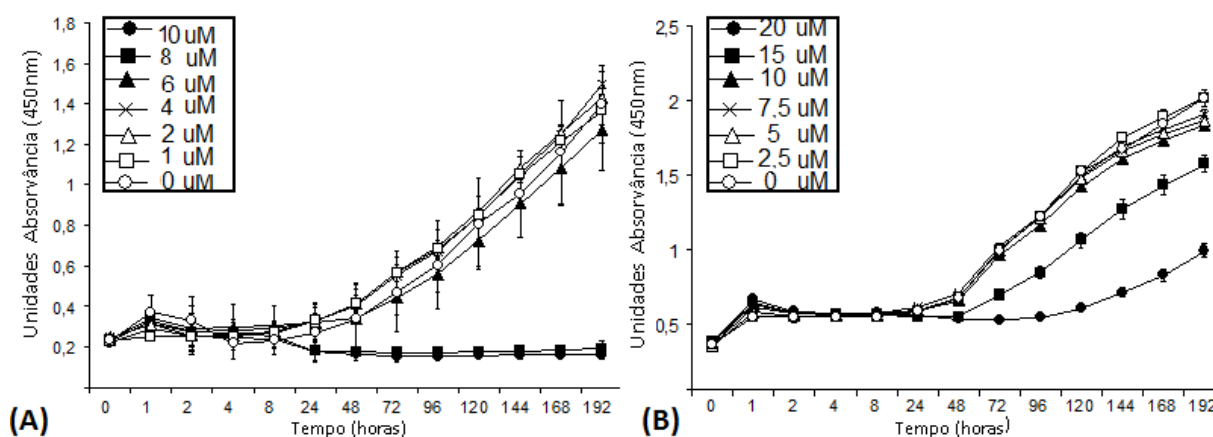


Figura 12 – Curvas de crescimento de *Anabaena* sp. (A) e *A. falcatus* (B) após exposição a diferentes concentrações de cobre durante um período de 192 horas. Os dados representam a média dos triplicados, os coeficientes de variação nunca excederam os 0,2 (20 %)

Embora as modificações registadas no crescimento celular possam servir como indicadores, os efeitos do Cu^{2+} no crescimento de algas e cianobactérias são atribuídos a falhas em diversos processos celulares que possuem uma diferente sensibilidade a este composto. Recentemente, têm sido utilizados indicadores de stress oxidativo que em combinação com parâmetros imunológicos, clorofila *a*, “stress proteins”, entre outros, permitem determinar a toxicidade do cobre para organismos aquáticos (Dewez *et al.*, 2005; Perales – Vela *et al.*, 2007; Knauert e Knauer, 2008; Torres *et al.*, 2008). Assim, neste ensaio expusemos *Anabaena sp.* e *A. falcatus*, a condições de stress oxidativo pela aplicação de 1 e 5 μM Cu^{2+} e 10 e 50 μM Cu^{2+} respectivamente e, através da medida de indicadores de stress oxidativo, avaliamos a diferente tolerância destes organismos ao stress e a eficácia dos mecanismos específicos de defesa antioxidante.

5.2.2. Danos oxidativos induzidos pelo Cu^{2+}

Na Figura 13. encontram-se representados os teores celulares de MDA, indicador da peroxidação lipídica, reflectindo assim o grau de dano oxidativo celular produzido em *Anabaena sp.* e *A. falcatus* pela aplicação de 1 e 5 μM Cu^{2+} e 10 e 50 μM Cu^{2+} , respectivamente.

A toxicidade do Cu^{2+} para algas e cianobactérias não está relacionada com um único modo de acção, na verdade ela interfere com vários aspectos do metabolismo incluindo a integridade protéica e a estabilidade das membranas (Nagalashimi e Prasad, 1998; Tesseire e Guy, 2000; Srivastava *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006). A destabilização das membranas, induzida por este metal, está maioritariamente ligada ao aumento da peroxidação lipídica pelo incremento na produção de EROs. Este processo, uma vez iniciado, pode causar danos oxidativos em membranas, lípidos e ácidos nucleicos (He e Häder, 2002; Pinto *et al.*, 2003, Mallick, 2004; Mishra *et al.*, 2008). De facto, neste ensaio verificou-se, indirectamente, que as células destas duas espécies estariam em stress oxidativo pelos incrementos significativos verificados na peroxidação lipídica (MDA).

Quando as células de *A. falcatus* foram expostas a 10 e 50 μM Cu^{2+} , e para um tempo de exposição de 24 horas, verificou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no conteúdo celular de MDA relativamente ao controlo, sugerindo a formação de EROs. Estes resultados são similares aos obtidos por Li *et al.* (2006) e Nagalakshmi e Prasad (1998) expondo as microalgas *Pavlova viridis* e *Scenedesmus bijugatus* a 3 mg L^{-1} e 100 e 200 μM Cu^{2+} , respectivamente. Inclusivé foi estabelecida uma correlação ($r = 0,96$) entre o aumento dos níveis de MDA nas células de *A.*

falcatus e o aumento da concentração de Cu^{2+} . Uma vez que os controlos referentes às 24 e 48 horas possuíam o mesmo conteúdo celular de MDA ($0,0198 \text{ mM L}^{-1}$), indicando que o nível básico de peroxidação lipídica era o mesmo, o decréscimo no conteúdo celular de MDA (5,56%) relativamente ao controlo, após 48 horas de exposição a $50 \text{ }\mu\text{M Cu}^{2+}$, deverá reflectir uma diminuição da produção de EROs ou um incremento na actividade de sequestração, ou remoção, das mesmas pela exposição ao cobre.

Comparativamente a *A. falcatus* ocorreu, no geral, maior peroxidação lipídica em *Anabaena* sp. De facto, para concentrações de Cu^{2+} de $1 \text{ }\mu\text{M}$, e para um tempo de exposição de 24 horas, ocorreu um maior incremento na peroxidação lipídica em *Anabaena* sp. (36,61 %) que o verificado em *A. falcatus* (22,73 %) após a exposição a $10 \text{ }\mu\text{M Cu}^{2+}$. Este diferente grau de dano oxidativo, produzido entre as duas espécies, poderá talvez explicar os efeitos fisiológicos verificados no crescimento.

O incremento de 46,36 % no conteúdo de proteína total (Figura 14.), verificado após exposição a $10 \text{ }\mu\text{M Cu}^{2+}$, sugere que *A. falcatus* responda ao stress aumentado a síntese de proteína, em particular “heat shock proteins”, que previnem o stress induzido nas membranas pela exposição a metais pesados (Mishra *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2008). Porém, para $50 \text{ }\mu\text{M Cu}^{2+}$, verificou-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) no conteúdo protéico (50,0 %) relativamente ao controlo. Este decréscimo deverá resultar de um aumento de EROs, cujo efeito pode ser o resultado de uma degradação da fracção protéica, resultante de danos de natureza oxidativa (Leitão *et al.*, 2003; Møller e Kristensen, 2004). De forma a averiguar se os danos oxidativos produzidos nas membranas lipídicas e na fracção protéica foram provocados por um aumento na produção de EROs, ou se estes foram resultantes de uma fraca activação de mecanismos de resposta antioxidante foram determinados os efeitos do Cu^{2+} na actividade da CAT e APX.

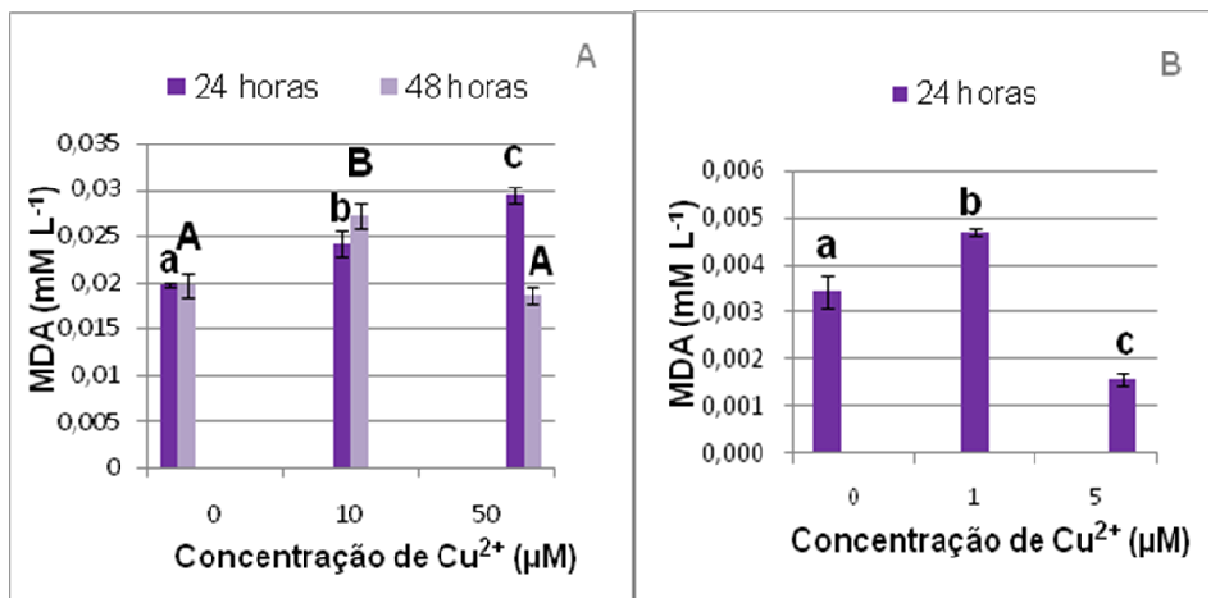


Figura 13 – Peroxidação lipídica em *A. falcatus* (A) e *Anabaena* sp. (B) e expostas a diferentes concentrações de cobre. A peroxidação lipídica foi medida através da produção de MDA. As barras representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados. Diferentes letras, presentes em cima das barras, denotam significância $p < 0,05$

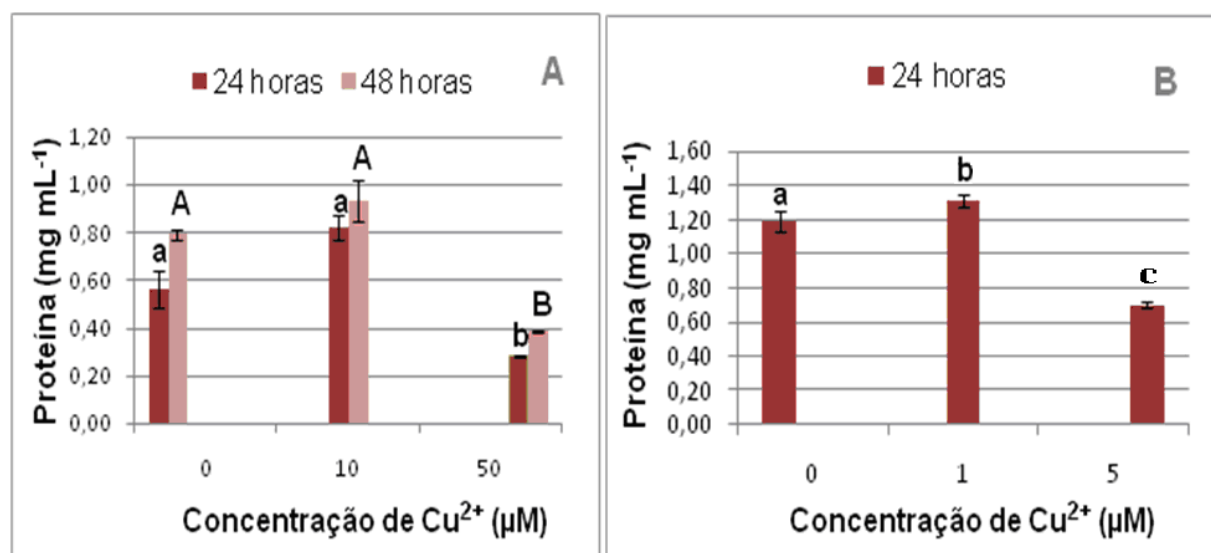


Figura 14 – Efeito de diferentes concentrações de cobre na proteína total em *A. falcatus* (A) e *Anabaena* sp. (B) expostas a diferentes concentrações de cobre. As barras representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados. Diferentes letras, presentes em cima das barras, denotam significância $p < 0,05$

4.1.1. Efeitos do Cu^{2+} na actividade enzimática

Nas Figura 15. e 16. encontra-se representada a resposta antioxidante enzimática de CAT e APX em *Ankistrodesmus falcatus* e *Anabaena* sp., resultante de stress oxidativo induzido pela aplicação de 1 e 5 μM Cu^{2+} e 10 e 50 μM Cu^{2+} , respectivamente. A actividade enzimática foi expressa em actividade específica, ou seja, actividade enzimática em relação ao teor de proteína da amostra.

A actividade antioxidante enzimática mostrou estar mais fortemente expressa na clorófito *A. falcatus* relativamente a *Anabaena* sp, o que torna a clorófito menos vulnerável a ataques provocados pelo stress induzido pelo Cu^{2+} . Em *A. falcatus*, apesar de se ter verificado um aumento do conteúdo de MDA até a maior concentração analisada (50 μM Cu^{2+}), foram igualmente registados incrementos significativos ($p < 0,05$) na actividade da CAT e APX (3,27 e 1,21 vezes o controlo) quando expostas às mesmas condições, o que indica o papel destas enzimas na sequestração das EROs formadas em excesso. Inclusivé, o nível de MDA mostrou estar correlacionado com a actividade da CAT ($r = 0,955$).

O aumento na actividade da CAT, bem como o verificado na APX, poderão resultar do incremento de H_2O_2 , já que este aumento poderá ter sido interpretado como um sinal, quer pelo operão *apx*, responsável pela regulação desta enzima, como ainda por um gene que codifica a CAT (Kawasaki e Aguirre, 2001; Vranova *et al.*, 2002; Mishra *et al.*, 2008). Resultados similares foram obtidos para diversas espécies de microalgas expostas a concentrações de Cu^{2+} compreendidas entre os 0,25 e os 100 μM Cu^{2+} (Nagalakshmi e Prasad, 1998; Mallick, 2004; Dewez *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2006). Embora tenha ocorrido uma activação de CAT e APX, a actividade destas enzimas, quando comparada, mostrou ser 6,36 vezes superior para a APX. Assim, a APX parece ser a principal enzima responsável pela sequestração de EROs nesta espécie. Estes resultados estão em consonância com os obtidos em *Ulva rígida* e *Cladophora glomerata*, nos quais a APX mostrou ser a enzima principal na sequestração de H_2O_2 (Collén e Pedersén, 1996; Choo *et al.*, 2004). Esta perspectiva de “two-way defence system”, sugerida por Mittler (2002), é hoje defendida por diversos autores e consiste na hipotética diferença de afinidade da APX (μM) e CAT (mM) para o substrato (H_2O_2) (He e Häder, 2002; Dazy *et al.*, 2009). Procedendo a uma análise dos dados referentes às 48 horas de exposição a 50 μM Cu^{2+} é possível verificar uma indução significativa ($p < 0,05$) na actividade da APX embora a sua actividade seja menor que a verificada às 24 horas de exposição.

Relativamente a *Anabaena* sp., foram verificados decréscimos significativos ($p < 0,05$) na actividade da CAT (0,63 e 0,67 vezes o controlo), quando as células foram expostas a 1 e 5 μM Cu^{2+} . Embora estes resultados estejam em consonância com os obtidos por diversos autores em *Anabaena doliolum*, o decréscimo da actividade ocorre geralmente para 10 e 50 μM Cu^{2+} , ou seja, para concentrações consideravelmente superiores às utilizadas neste ensaio (Srivastava *et al.*, 2005; Srivastava *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2008). Contudo, o decréscimo registado deverá resultar de uma produção de excessiva EROs, que ao perturbar a actividade catalítica das proteínas as torna mais susceptíveis a um ataque protolítico (Mishra *et al.*, 2008). Tal como o verificado para *A. falcatus*, a APX indica ser a principal enzima envolvida na sequestração de EROs, tendo ocorrido um aumento significativo na sua actividade para 1 e 5 μM Cu^{2+} (5,85 e 7,46 vezes o controlo, respectivamente) ($p < 0,05$). De facto, para *Anabaena doliolum*, estão documentados incrementos na actividade desta enzima mesmo quando exposta a concentrações de cobre de 40 e 50 μM Cu^{2+} (Srivastava *et al.*, 2005; Srivastava *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2008). Apesar desta indução da APX, a produção de EROs não foi balanceada com uma adequada actividade de sequestração.

Estes resultados parecem indicar que os danos oxidativos produzidos nas células de *A. falcatus* deverão resultar de uma produção excessiva de EROs, e não de uma baixa activação de antioxidantes enzimáticos responsáveis pela sequestração das EROs. Pelo contrário em *Anabaena* sp., os danos oxidativos produzidos em lípidos e proteínas deverão ter sido provocados por uma “avaria” do sistema de sequestração de EROs exercido pela CAT.

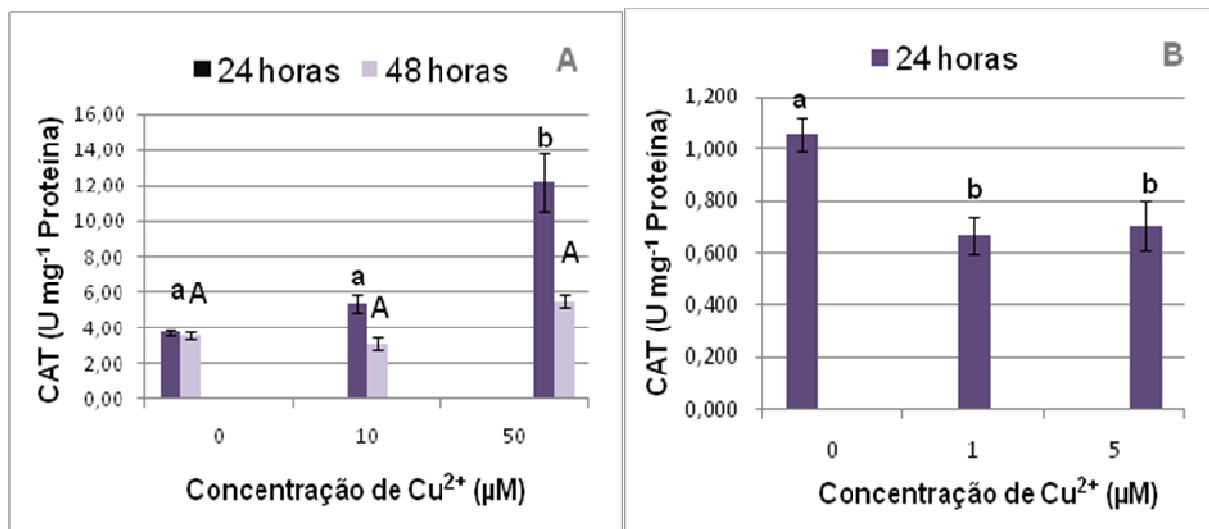


Figura 15 – Efeito de diferentes concentrações de cobre na actividade da CAT em *A. falcatus* (A) e *Anabaena* sp. (B) expostas a diferentes concentrações de cobre. As barras representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados. Diferentes letras, presentes em cima das barras, denotam significância $p < 0,05$

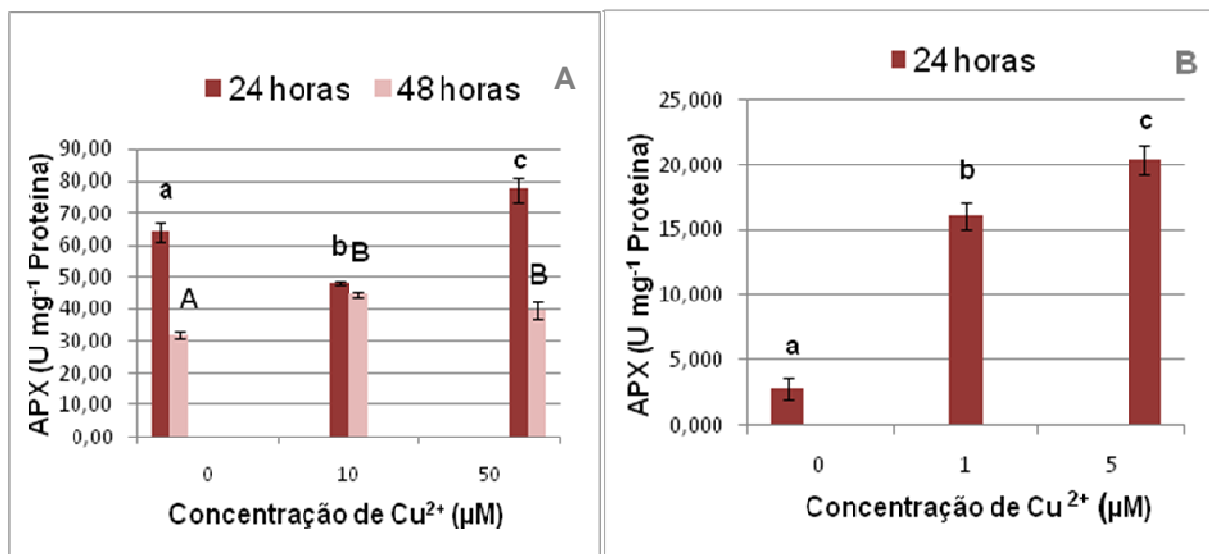


Figura 16 – Efeito de diferentes concentrações de cobre na actividade da APX em *A. falcatus* (A) e *Anabaena* sp. (B) expostas a diferentes concentrações de cobre. As barras representam as médias \pm desvio padrão dos triplicados. Diferentes letras, presentes em cima das barras, denotam significância $p < 0,05$

6. CONCLUSÃO

Os resultados presentes nesta dissertação permitem, em certo grau, compreender melhor os mecanismos bioquímicos (actividade antioxidante e danos oxidativos) e fisiológicos (inibição no crescimento) adoptados por cianobactérias formadoras de *blooms* (*Anabaena* sp. e *Aphanizomenon gracile*) e por uma clorófita (*Ankistrodesmus falcatus*) quando cultivados em condições que induzem o stress oxidativo.

Neste trabalho foram utilizados, sulfato de cobre e triptamina, compostos com propriedades algicidas, simulando deste modo o stress oxidativo que seria introduzido num sistema dulçaquícola e, conseqüentemente, nas células destes organismos. Apesar de para o sulfato de cobre já estarem descritos mecanismos bioquímicos e fisiológicos adoptados por estas espécies, para a triptamina, composto natural com potencial algicida, existia uma lacuna de informação relativa aos mecanismos bioquímicos induzidos pela exposição a este composto. Para melhor entender estes mecanismos foi desenvolvida uma metodologia para a extracção e análise da actividade enzimática de CAT e APX, indicadores indirectos de stress oxidativo celular, em duas espécies de cianobactérias e numa clorófita.

A exposição de espécies de cianobactérias formadoras de *blooms* (*Anabaena* sp. e *A. gracile*) e clorófita (*A. falcatus*) à triptamina e ao Cu^{2+} causa um desequilíbrio no estado redox celular, ocorrendo um incremento significativo da produção de EROs. Em resposta a este sinal, ocorre um incremento significativo na actividade de sequestração das mesmas, verificando-se uma diferente resposta, e sensibilidade, no sistema de defesa antioxidante enzimático, o que mostra que as estratégias de defesa contra as EROs podem variar consoante a espécie e o composto testado. De uma forma geral, a APX é a principal enzima responsável pela sequestração de EROs em cianobactérias e na clorófita, embora em *A. falcatus* se tenha verificado uma significativa activação de CAT após 24 horas de exposição a $50 \mu\text{M Cu}^{2+}$. De facto, a actividade antioxidante enzimática está mais fortemente expressa na clorófita (*A. falcatus*) relativamente às cianobactérias (*Anabaena* sp. e *A. gracile*), logo menos vulnerável a ataques de compostos que causam stress oxidativo, o que pode, em parte, explicar os efeitos fisiológicos que incluem inibição irreversível do crescimento em cianobactérias. Contudo, para perceber melhor a dinâmica da regulação dos sistemas de defesa antioxidante nestes organismos, bem como a diferente tolerância ao stress oxidativo, é necessário desenvolver mais estudos, em particular sobre a actividade antioxidante não-enzimática.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H (1982).** Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, **105**: 121 – 126
- Alamsjah MA, Hirao S, Ishibashi F, Fujita Y (2005).** Isolation and structure determination of algicidal compounds from *Ulva fasciata*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **69 (11)**: 2186 – 2192
- Ali MB, Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2005).** Differential responses of anti-oxidants enzymes, lipoxygenase activity, ascorbate content and the production of saponins in tissue cultured root of mountain *Panax ginseng* C.A. Mayer and *Panax quinquefolium* L. in bioreactor subjected to methyl jasmonate stress. *Plant science*, **169**: 83 – 92
- Almeida ME, Teixeira HE, Koester LS (2008).** Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. *Latin American Journal of Pharmacy*, **27(5)**: 780 – 8
- Anderson JH, Schuter L, Ærtebjerg G (2006).** Coastal eutrophication: recent developments in definitions and implications for monitoring strategies. *Journal of Plankton Research*, **28(7)**: 621 – 628
- Andrade L, Farina M, Amado-Filho G (2004).** Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) *in vitro*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **58**: 117 – 125
- Araújo F (2006).** Cinobacterias: Ocorrências y gestión del riesgo en Portugal de 1993 a 2005. *In: Jornada sobre las Cianobacterias tóxicas. Problemas asociados. Seguimiento y control*, Espanha
- Aravind P, Prasad MNV (2004).** Zinc protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L., a freshwater macrophyte. *Plant Science*, **166(5)**: 1321 – 1327
- Azevedo SMFO, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK (2002).** Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. *Toxicology*, **(181-182)**: 441 – 446
- Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C (2005).** Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **140**: 175 – 186
- Bagchi S, Chauhan V, Marwah B (1993).** Effect of an antibiotic from *Oscillatoria late-virens* on growth, photosynthesis, and toxicity of *Microcystis aeruginosa*. *Current Microbiology*, **26**: 223 – 228
- Bhargava P, Mishra Y, Srivastava A, Narayan OP, Rai L (2008).** Excess copper induces anoxygenic photosynthesis in *Anabaena doliolum*: a homology based proteomic assessment of its survival strategy. *Photosynthesis Research*, **96**: 61 – 74
- Bartram J, Carmichael WW, Chorus I, Jones G, Skulberg OM (1999).** Introduction. *In: Chorus I, Bartram J (Eds.). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO, London e New York. Pp. 12 – 24

- Behm D (2003).** Coroner cites algae in teen's death. *In: Milwaukee Journal Sentinel*, Milwaukee. Disponível a 19 de Setembro de 2008, em: <http://www2.jsonline.com/news/state/sep03/167645.asp>
- Berry JB, Gantar M, Perez MH., Berry G, Noriega FG (2008).** Cyanobacterial Toxins as Allelochemicals with Potential Applications as Algaecides, Herbicides and Insecticides. *Mar Drugs*, **6**: 117-146
- Boyd C, Massaut L (1999).** Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquaculture Engineering* **20**: 113 – 132
- Bradford MM (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248–254
- Briand J, Jacquet S, Bernard C, Humbert J (2003).** Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research*, **34**: 361 – 377
- Byth S (1980).** Palm Island mystery disease. *Medical Journal of Australia*, **2**: 40 – 42
- Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK (2001).** Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, **109(7)**: 663 – 668
- Carmichael WW (2008).** A world overview — One-hundred-twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria — Where do we go from here? *In: Hudnell HK (Ed.). Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York. Pp. 105 – 126
- Choo KS, Snoeijs P, Pedersen M (2004).** Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlneriana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **298**: 111 – 23
- Chorus I, Mur L (1999).** Preventative Measures. *In: Chorus, I. and Bartram, J (Eds.). Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management*. WHO, London e New York. Pp. 235 – 273
- Chung IM, Ali M, Ahmad A, Chun SC, Kim JT, Sultana S, Kim JS., Min SK, Seo BR (2007).** Steroidal constituents of rice (*Oryza sativa*) hulls with algicidal and herbicidal activity against blue-green algae and duckweed. *Phytochemical Analysis* **18**: 133 – 145
- Churro C (2007).** Natural algicides against harmful microalgae : screening the bacillamide potential as a prevention tool for cyanobacteria blooms. Dissertação de mestrado em Microbiologia. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro
- Churro C, Alverca E, Sam-Bento F, Paulino S, Figueira V, Bento AJ, Prabhakar S, Lobo AM, Calado AJ, Pereira P (2008).** Effects of bacillamide and newly synthesized derivatives on the growth of cyanobacteria and microalgae cultures. *Journal of Applied Phycology*, in press
- Codd GA (2000).** Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*, **16**: 51 – 60
- Codd GA, Morrison L, Metcalf SJ (2005).** Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **203**: 264 – 272

- Codd GA, Azevedo SMFO, Bagchi SN, Burch MD, Carmichael WW, Harding WR, Kaya K, Utkilen HC (2005b).** CYANONET, A Global Network for Cyanobacterial Bloom and Toxin Risk Management. *In: Initial Situation Assessment and Recommendations. Technical Documents in Hydrology.* UNESCO, Paris. Pp. 76
- Collén J, Pedersén M (1996).** Production, scavenging and toxicity of hydrogen peroxide in the green seaweed *Ulva rigida*. *European Journal of Phycology*, 31(3): 265 — 271
- Csaba G (1993).** Presence in and effects of pineal indoleamines at very low level of phylogeny. *Experientia*, 49: 627 – 634
- Cuppett JD, Duncan SE, Dietrich AM (2006).** Evaluation of Copper Speciation and Water Quality Factors That Affect Aqueous Copper Tasting Response. *Chemical Senses*, 31: 689 – 697
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F (2000).** Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science*, 57: 779 – 95
- Dazy M, Masfaraud JF, Féraud JF (2009).** Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere*, in press
- Decreto-lei 306/2007 (Diário da República, 1.ª série - N.º 164 – 27 de Agosto de 2007)**
- DellaGreca M, Fiorentino A, Isidori M, Lavorgna M, Monaco P, Previtera L, Zarrelli A (2002).** Phenanthrenoids from the wetland *Juncus acutus*. *Phytochemistry*, 60: 633 – 638
- DellaGreca M, Fiorentino A, Monaco P, Previtera L, Temussi F, Zarrelli A (2003).** New dimeric phenanthrenoids from the rhizomes of *Juncus acutus*. Structure determination and antialgal activity. *Tetrahedron*, 59: 2317 – 2324
- DellaGreca M, Fiorentino A, Monaco P, Previtera L, Temussi F, Zarrelli A (2003b).** Benzocoumarins from the rhizomes of *Juncus acutus*. *Tetrahedron*, 59: 4821 – 4825
- Demiral T, Türkan I (2005).** Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 53:247 – 257
- Dethloff GM, Bailey HC, Maier KJ (2001).** Effects of dissolved copper on select hematological, biochemical, and immunological Parameters of Wild Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 40: 371 – 380
- Dewez D, Geoffroy L, Vernet G, Popovic R (2005).** Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquatic Toxicology*, 74: 150 – 159
- Di Giulio RT, Washburn PC, Wenning RJ, Wiston GW, Jewel CS (1989).** Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8: 1103 – 1123
- Di Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin PR (2001).** Biotic ligand model of the acute toxicity of metals.1. Technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10: 2383 – 2396

- Drábková M, Admiraal W, Maršálek B (2007).** Combined Exposure to Hydrogen, peroxide and lights selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Environmental Science & Technology*, **41**: 309 – 314
- Etchegaray A, Rabello E, Dieckmann R, Moon DH, Fiore MF, Döhren H, Tsai SM, Neilan BA (2004).** Algicide production by the filamentous cyanobacterium *Fischerella* sp. CENA19. *Journal of Applied Phycology*, **16**: 237 – 243
- Ferreira FMB, Soler JMF, Fidalgo ML, Fernández-Vila P (2001).** PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma – Lever reservoir (Douro river, Northern Portugal). *Toxicon*, **39**: 757 – 761
- Ferreira F, Ferreira R, Duarte JA (2007).** Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Revista Portuguesa de ciências do desporto*, **7**: 257 – 275
- Fialkowsak E, Pajdak-Stos A (2002).** Dependence of cyanobacteria defense mode on grazer pressure. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**: 149 – 157
- Figueiredo D, Reboleira A, Antunes S, Abrantes N, Azeiteiro U, Gonçalves F, Pereira M (2006).** The effect of environmental parameters and cyanobacterial blooms on phytoplankton dynamics of a portuguese temperate lake. *Hydrobiologia*, **568**: 145 – 157
- Fristachi e Sinclair (2008).** Occurrence of Cyanobacterial Harmfull Blooms: Workgroup Report. In: Hudnell HK (Ed.). *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York. Pp. 45 – 104
- Freundlich e Lichstein (1962).** Tryptophanase-tryptophan synthetase systems in *Escherichia coli*. I. Effect of tryptophan and related compounds. *Journal Bacteriology*, **84**: 979 – 987
- Fulton RSI, Paerl HW (1988)** Effects of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* on zooplankton competition relations. *Oecologia*, **76**: 383 – 389
- Funari E, Testai E (2008).** Human Health Risk Assessment Related to Cyanotoxins Exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, **38**: 97 – 125
- Gantar M, Berry JP, Thomas S, Wang M, Perez R, Rein KS, King G (2008).** Allelopathi activity among Cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. *FEMS Microbiol Ecology*, **64** (1): 55 – 64
- García-Villada L, Rico M, Altamirano M, Sánchez-Martín L, López-Rodas V, Costas E (2004).** Occurance of copper resistant mutants in the toxic Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterization and future implications in the use of copper sulfate as algicide. *Water Research*, **38**: 2207 – 2213
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005).** Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, **32**: 481 – 494
- Halliwell B (2006).** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, **(14)**: 312 – 322
- Halliwell B (2007).** Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, **35**: 1147 – 1150

- Halliwell B, Whiteman M (2004).** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, **142**: 231–255
- Haughey MA, Anderson MA, Witney RD, Taylor WD, Losee RF (2000).** Forms and fate of Cu in a source drinking water reservoir following CuSO₄ treatment. *Water research*, **13**: 3344 – 3452
- He YY, Häder DP (2002).** Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **1**: 729 – 736
- Hehmann A, Kaya K, Watanabe M (2002).** Selective control of Microcystis using an amino acid-a laboratory assay. *Journal of Applied Phycology*, **14**: 85 – 89
- Hitzfeld BC, Höger SJ, Dietrich DR (2000).** Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment and human risk assessment. *Environmental Health Perspectives Supplements*, **108 (S1)**: 113 – 122
- Hong Y, Hua HY, Xie X, Li FM (2008).** Responses of enzymatic antioxidants and non-enzymatic antioxidants in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa to the allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) isolated from reed (*Phragmites communis*). *Journal of Plant Physiology*, **165**: 1264 – 1273
- Hong Y, Hu HY, Xie X, Sakoda A, Sagehashi M, Li FM (2009).** Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*, in press
- Crudey S, Burch M, Drikas M, Gregory R (1999).** Remedial measures. In: Chorus, I. and Bartram, J (Eds.). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management*. WHO, London e New York. Pp. 275 – 312
- Ibelings WB, Chorus I (2007).** Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution*, **150**: 177 – 192
- Jewett EB, Lopez CB, Dortch Q, Etheridge SM, Backer LC (2008).** Harmful algal bloom management and response: assessment and plan. In: *Interagency Working Group on Harmful Algal Blooms, Hypoxia, and Human Health of the Joint Subcommittee on Ocean Science and Technology*, Washington D.C.
- Jeong S, Ishida K, Ito Y, Okada S, Murakami M (2003).** Bacillamide—a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. *Tetrahedron Letters*, **44**: 8005 – 8007
- Karch SB (2008).** Hallucinogens. In: Karch B (Ed.). *Karch's Pathology of Drug Abuse*. CRC Press, Boca Raton. Pp. 313 – 351
- Kawasaki L, Aguirre J (2001).** Multiple catalase gene are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Bacteriology*, **183**: 1434 – 1440
- Kim BH, Choi HJ, Han MS (2008a).** *In situ* bacterial mitigation of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: implications for biological bloom control. *Limnology and Oceanography Methods* (**6**): 513 – 522

- Kim JC, Lee S, Lee B, Cho K (2006b).** Biological activity of L-2-azetidinecarboxylic acid, isolated from *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*, against several algae. *Aquatic Botany*, **85**: 1 – 6
- Kim JY, Alamsjah MA, Hamada A, Fujita Y, Ishibashi F (2006a).** Algicidal diterpenes from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **70(10)**: 2571 – 2574
- Kim MJ, Jeong SY, Lee SJ (2008b).** Isolation, identification, and algicidal activity of marine bacteria against *Cochlodinium polykrikoides*. *Journal of Applied Phycology*, **20**: 1069 – 1078
- Knauert S, Knauer K (2008).** The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae. *Journal of Phycology*, **44(2)**: 311 – 319
- Kodani S, Imoto A, Mitsutani A, Murakami M (2002).** Isolation and identification of the antialgal compound, harmaline (1-methyl- β -carboline), produced by the algicidal bacterium, *Pseudomonas* sp. K44-1. *Journal of Applied Phycology* **14**: 109 – 114
- Krienitz L, Ballot A, Kotut K, Wiegand C, Pütz S, Metcalf S (2003).** Contribution of hot spring Cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiology Ecology*, **43**: 141– 8
- Kuiper – Goodman T, Falconer I, Fitzgerald J (1999).** Human health aspects. In: Chorus I, Bartam J (Eds.). *Toxic Cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO, London e New York. Pp. 125 – 160
- Kumar S, Habib K, Fatma T (2008).** Endosulfan induced biochemical changes in nitrogen-fixing cyanobacteria. *Science of the total environment*, **40**: 130 – 138
- Lee SO, Kato J, Takiguchi N, Kuroda A, Ikeda T, Mitsutani A, Ohtake H (2000).** Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain A28. *Applied Environmental Microbiology*, **66**: 4334 – 4339
- Leflaive J. e Ten-Hage L (2007).** Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins: special review. *Freshwater Biology*, **52**: 199 – 214
- LeGrande C, Rengefors G, Fistarol GO, Graneli E (2003).** Allelopathy in phytoplankton - biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia* **42**: 406 – 419
- LeJeune, Charpin M, Deluchat V, Briand J, Lenain J, Baudu M, Amblard C (2006).** Effect of copper sulphate treatment on natural phytoplanktonic communities. *Aquatic Toxicology*, **80**: 267 – 280
- Leitao M, Cardozo KHM, Pinto E, Colepicolo P (2003).** PCB induced oxidative stress in the unicellular marine dinoflagellates *Lingulodinium polyedrum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **45**: 59 – 65
- Leu E, Krieger-Liszka A, Goussias C, Gross EM (2002).** Polyphenolic allelochemicals from the aquatic Angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II. *Plant Physiology*, **130**: 2011 – 2018
- Li F e Hu H (2005).** Isolation and Characterization of a Novel Antialgal Allelochemical from *Phragmites communis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71(11)**: 6545 – 6553

- Li M, Hu CW, Zhu Q, Chen L, Kong ZM, Liu ZL (2006).** Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere*, **62**: 565 – 72
- Livingstone DR (2001).** Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, **42**: 656 – 66
- Lopez CB., Jewett EB, Dortch Q, Walton BT, Hudnell HK (2007).** Scientific Assessment of Freshwater Harmful Algal Blooms. In: *Interagency Working Group on Harmful Algal Blooms, Hypoxia, and Human Health of the Joint Subcommittee on Ocean Science and Technology*. Washington DC
- Lovejoy C, Bowman JP, Hallegraeff GM (1998).** Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class Proteobacteria, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Applied Environmental Microbiology*, **64**: 2806 – 2813
- MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA (1990).** Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plant. *FEBS Letters*, **264**: 187 – 192
- Madhava Rao KV, Sresty TVS (2000).** Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant science*, **157**: 113 – 128
- Malbrouck C, Kestemont P (2006).** Effects of microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25(1)**: 72 – 86
- Mallick N, Singh AK, Rai LC (1990)** Impact of bimetallic combinations of Cu, Ni and Fe on growth rate, uptake of nitrate and ammonia, ¹⁴CO₂ fixation, nitrate reductase and urease activity of *Chlorella vulgaris*. *Biology of metals*, **2**: 223 – 228
- Mallick N, Mohn FH (2003).** Use of chlorophyll fluorescence in metal stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **55**: 64 – 69.
- Mallick N (2004).** Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *Journal Plant Physiology*, **161**: 591 – 7
- Men YJ, Hu HY, Li FM (2007).** Effects of the novel allelochemical ethyl 2-methylacetoacetate from the reed (*Phragmites australis* Trin) on the growth of several common species of green algae. *Journal of Applied Phycology*, **19**: 521 – 527
- Meepagala K, Schader K, Wedge D, Duke S (2005).** Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. *Phytochemistry*, **66**: 2689 – 2695
- Mishra Y, Bhargava P, Thapar R, Srivastava A, Rai LC (2008).** A comparative study of antioxidative defense system in the copper and temperature acclimated strains of *Anabaena doliolum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**: 2997 – 3004
- Mishra Y, Bhargava P, Rai LC (2005).** Differential induction of enzymes and antioxidants of the antioxidative defense system in *Anabaena doliolum* exposed to heat stress. *Journal of Thermal Biology*, **30**: 524 – 531

- Mittler R (2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**: 405 – 410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, van Breusegem F (2004).** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, **9(10)**: 490 – 498
- Mizuno CS, Schrader KK, Rimando AG (2008).** Algicidal activity of stilbene analogues. *Journal of agricultural and food chemistry*, **56**: 9140 – 9145
- Mokkila M, Mustranta A, Buchert J, Poutanen K (2004).** Combining power ultrasound with enzymes in berry juice processing. In: *2nd International Conference on Biocatalysis in the Food and Drinks*, Germany
- Møller IM, Kristensen BK (2004).** Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. **3**: 730 – 735
- Mur L, Skulberg OM, Utkilen H (1999).** Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I, Bartam J (Eds.). *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO, London e New York. Pp. 25 – 54
- Nagalakshmi N, Prasad MNV (1998).** Copper-induced oxidative stress in *Scenedesmus bijugatus*: protective role of free radical scavengers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **61**: 623 – 8
- Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, Murakami A (2000).** *Myriophyllum spicatum* released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*. **34**: 3026 – 3032
- Nakai S, Yamada S, Hosomi M (2005).** Anti-cyanobacterial fatty acids released from *Myriophyllum spicatum*. *Hydrobiologia*, **543**: 71 – 78
- Nakashima T, Miyazaki Y, Matsuyama Y, Muraoka W, Yamaguchi K, Oda T (2006).** Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium α -proteobacterium. *Applied Microbial and Cell physiology*, **73**: 684 – 690
- Nakamura N, Nakano K, Sugiura N, Matsumura M (2003).** A Novel Cyanobacteriolytic Bacterium, *Bacillus cereus*, Isolated from a Eutrophic Lake. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **95(2)**: 179 – 184
- Nishiwaki – Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Sugunuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujuki H (1992).** Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **118**: 420 – 424
- Oliver RL e Ganf GG (2000).** Freshwater Blooms. In: Witton BA, Potts M (Eds.). *The ecology of cyanobacteria – Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Pp. 149 – 194
- Park MH, Hwang SJ, Ahn CY, Kim BH, Oh HM (2006).** Screening of Seventeen Oak Extracts for the Growth. Inhibition of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Kütz. em. Elenkin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **77**: 9 – 14

- Park MH, Chung III-Min, Ahmad A, Kim BH, Hwang SJ (2009).** Growth inhibition of unicellular and colonial *Microcystis* strains (Cyanophyceae) by compounds isolated from rice (*Oryza sativa*) hulls. *Aquatic Botany*, in press
- Pereira P, Dias E, Franca S, Pereira E, Carolino M, Vasconcelos VM (2004).** Accumulation and depuration of cyanobacterial paralytic shellfish toxins by the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Aquatic Toxicology*, **68**: 339 – 350
- Pearl H (2008).** Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater–marine continuum. In: Hudnell HK. (ed.) *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer. Pp. 217 – 238
- Perales-Vela HV, González-Moreno S, Montes-Horcasitas C, Cañizares-Villanueva RO (2007).** Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*, **67**: 2274 – 2281
- Perovich G, Dortch Q, Goodrich J (2008).** Causes, Prevention, and Mitigation Work Group Report. In: Hudnell HK. (ed.) *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer. Pp. 185 – 216
- Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leitao MA, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P (2003).** Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, **39**: 1008 – 18
- Pybus MJ, Hobson DP (1986)** Mass mortality of bats due to probable blue–green algal toxicity. *Journal of Wildlife Diseases*. **22(3)**: 449 – 450
- Rai LC, Husaini Y, Mallick N (1996).** Physiological and biochemical responses of *Nostoc linckia* to combined effects of aluminium, fluoride and acidification. *Environmental and Experimental Botany*, **36(1)**: 1 – 12
- Ratkevicius N, Correa JA, Moenne A (2003).** Copper accumulation, synthesis of ascorbate and activation of ascorbate peroxidase in *Enteromorpha compressa* (L.) Grev. (Chlorophyta) from heavy metal-enriched environments in northern Chile. *Plant, cell & environment*. **26**: 1599 – 608
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979).** Generic assignments, Strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, **111**: 1 – 61
- Rohrlack T, Dittmann E, Henning M, Börner T, Kohl JG (1999).** Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 737 – 9
- Roussel H, Ten-Hage L, Joachim S, Cohu R, Gauthier L, Bonzon J (2007).** A longterm copper exposure on freshwater ecosystems using lotic mesocosms: Primary producer community responses. *Aquatic Toxicology*, **81**: 168 – 182
- Saker ML, Nogueira IC, Vasconcelos VM (2004).** Distribution and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) in Portuguese freshwaters. *Limnetica*, **23(1-2)**: 145 – 152
- Scandalios JC (2005).** Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **38**: 995 – 1014

- Schrader KK, Dayan FE, Nanayakkara NPD (2005).** Generation of reactive oxygen species by a novel anthraquinone derivative in the cyanobacterium *Planktothrix perornata* (Skuja). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **81**: 198 – 207
- Schopf JW (2000).** The fossil record: Tracing the roots of cyanobacterial lineage. In: Witton BA, Potts M (Eds.). *The ecology of Cyanobacteria – Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp. 13 – 35
- Shavyrina OB, Gapochka LD, Azovskii (2001).** Development of tolerance for copper in cyanobacteria repeatedly exposed to its toxic effect. *Biology Bulletin*, **28(2)**: 183 – 187
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002).** Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of experimental Botany*, **53(372)**: 1305 – 1319
- Singh N, Ma LQ, Srivastava M, Rathinasabapathi B (2006).** Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science*, **170**: 274 – 282
- Sinha RP, Häder DP (2008).** UV-protectants in Cyanobacteria. *Plant Science*, in press
- Skulberg R, Skulberg O (1990).** Forskning med algekulturer NIVAs kultursampling av alger. NIVA, Norway.
- Soares GLG, Scalon VR, Pereira TO, Vieira DA (2002).** Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de algumas Leguminosas arbóreas brasileira. *Floresta e Ambiente*, **9**: 119 – 126
- Socha A, Long R, Rowley D (2007).** Bacillamides from a hypersaline microbial mat bacterium. *Journal of natural products*, **70**: 1793 – 1795
- Soldo D, Behra R (2000).** Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology*, **47**: 181 – 189
- Srivastava A, Bhargava P, Rai LC (2005).** Salinity and copper induced oxidative damage and changes in the antioxidative defense systems of *Anabaena doliolum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**: 1291 – 1298
- Srivastava A, Bhargava P, Mishra Y, Shukla B, Rai LC (2006).** Effect of pretreatment of salt, copper and temperature on ultraviolet-B-induced antioxidants in diazotrophic cyanobacterium *Anabaena doliolum*. *Journal of Basic Microbiology*. **46(2)**: 135 – 144
- Stewart I, Schluter PJ, Shaw GR (2006).** Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environmental Health*, **5**:7
- Su JQ, Yang XR, Zheng TL, Tian Y, Jiao N, Cai LZ, Hong HS (2007).** Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*, **6**: 799 – 810
- Sunda WG, Guillard RRL (1976).** The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *Journal of Marine Research*, **34**: 511 – 529

- Teixeira MGLC, Costa MCN, Carvalho VLP, Pereira MS, Hage E (1993).** Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica, Bahia (Brazil). *Bulletin of Bulletin of the Pan American Health Organization*, **27(3)**: 244 – 253
- Teisseire H, Guy V (2000).** Copper-induced change in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science*, **153**: 65 – 72
- Tellez MR, Dayan FE, Schrader KK, Wedge DE, Duke SO (2000).** Composition and some biological activities of the essential oil of *Callicarpa americana* (L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, **48**: 3008 – 3012
- Thomas JC, Adams DC, Nessler C, Brown JK, Bohnert HJ (1995).** Tryptophan decarboxylase, tryptamine, and reproduction of the Whitefly. *Plant Physiology*, **109**: 717 – 720
- Thomas JC, Akroush A, Adamus G (1999).** The indole alkaloid tryptamine produced in transgenic *Petunia hybrid*. *Plant Physiology biochemistry*, **37 (9)**: 665 – 670
- Torres M A, Barros MP, Campos SCG, Pinto E , Rajamani S , Sayre RT, Colepicolo P (2007).** Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **71**: 1 – 15
- Turner PC, Gammie AJ, Hollinrake K, Codd GA (1990).** Pneumonia associated with cyanobacteria. *British Medical Journal*, **300**: 1440 – 1441
- UNESCO (2006).** Water, a shared responsibility. In: *World water assessment programme*. The United Nations World Water Report 2, Paris & Nova York
- UN (2008).** Tackling a global crisis. International Year of Sanitation 2008. United Nations, New York. Pp.32
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M (2006).** Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **64**: 178 – 189
- van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJ, Bakker GJ (2007).** Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**: 7– 60
- van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM (1995).** Cyanophyta. In: *Algae – An introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 16 – 34
- van Hullebusch E, Chatenet P, Deluchat V, Chazal PM, Froissard D, Botineau M, Ghestem A, Baudu M (2003).** Copper accumulation in a reservoir ecosystem following copper sulfate treatment (St. Germain Les Belles, France). *Water Air Soil Pollution*, **150**: 3 – 22
- Vasconcelos V (2001).** Cyanobacterial toxins: diversity and ecological effects. *Limnetica*, **20(1)**: 4 – 58
- Vasconcelos V (2006).** Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. *Limnetica*, **25(1-2)**: 425 – 432
- Vasconcelos VM, Wiegand C, Pflugmacher S (2007).** Dynamics of glutathione-S-transferases in *Mytilus galloprovincialis* exposed to toxic *Microcystis aeruginosa* cells, extracts and pure toxins. *Toxicon*, **50**: 740 – 745

- Vitousek PM, Aber J, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schlesinger WH, Tilman GD (1997).** Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. *Ecological Applications*, **7**: 737 – 750
- Volk R (2005).** Screening of microalgal culture media for the presence of algicidal compounds and isolation and identification of two bioactive metabolites excreted by the cyanobacteria *Nostoc insulare* and *Nodularia harveyana*. *Journal Applied Phycology*, **17**: 339 – 347
- Volk R (2006).** Antialgal activity of several cyanobacterial exometabolites. *Journal Applied Phycology*, **18**: 145 – 151
- Volk R, Furkert F (2006).** Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiol Res*, **161**:180 – 186
- Volk R (2007).** Studies on culture age versus exometabolite production in batch cultures of the cyanobacterium *Nostoc insulare*. *Journal Applied Phycology*, **19**: 491 – 495
- Volk R, Mundt (2007).** Cytotoxic and non-cytotoxic exometabolites of the cyanobacterium *Nostoc insulare*. *Journal Applied Phycology*, **19**: 55 – 62
- Vranova E, Inze D, Breusegem FV (2002).** Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, **53**:1227 – 1236
- Ward MD, Castenholtz WR (2000).** Cyanobacteria in Geothermal habitats. In: Witton BA, Potts M (Eds.). *The ecology of Cyanobacteria – Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp. 37 – 59
- Wassmann P, Olli K (2004).** Introduction. In: Wassment P, Olli K (Eds.). *Drainage basin nutrient inputs and eutrophication: an integrated approach*. University of Tromsø, Norway. Pp. ix – xvi
- Whitton BA, Potts M (2000).** Introduction to the Cyanobacteria. In: Witton BA, Potts M (Eds.). *The ecology of Cyanobacteria – Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp. 1 – 11
- WHO (1998).** Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in drinking-water. In: *Background document for development of WHO Guidelines for Drinking – water Quality*. World Health Organization, Geneve
- Wolfe-Simon F, Grzebyk D, Schofield O, Falkowski Paul G (2005).** The role and evolution of superoxide dismutases in algae. *Journal of phycology*, **41(3)**: 453 – 465
- Wu ZX, Gan NQ, Huang Q, Song LR (2007).** Response of Microcystis to copper stress e Do phenotypes of *Microcystis* make a difference in stress tolerance? *Environmental Pollution*, **147**: 324 – 330
- Xian Q, Chen H, Liu H, Zou H, Yin D (2006).** Isolation and Identification of Antialgal Compounds from the Leaves of *Vallisneria spiralis* L. by Activity-Guided Fractionation. *Environmental science and pollution research*, **13 (4)**: 233 – 237

ANEXO I

Composição do meio de cultura Z₈

Quadro 9 – Composição do meio utilizado no cultivo de cianobactérias e clorófitas utilizadas nos ensaios. As quantidades foram adicionadas a 1000 mL de água desionizada (Churro, 2007)

Quantidade	Composto	Solução stock
Solução A (10mL)	NaNO ₃	46,7 g L ⁻¹ dd H ₂ O
	Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	5,9 g L ⁻¹ dd H ₂ O
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,5 g L ⁻¹ dd H ₂ O
Solução B (10mL)	K ₂ PO ₄	3,1 g L ⁻¹ dd H ₂ O
	NaCO ₃	2,1 g L ⁻¹ dd H ₂ O
1mL	Solução de micronutrientes	Quadro 10
10mL	Solução Fe – EDTA	a

Composição solução Fe – EDTA: 10 mL Sol. C + 9,5 mL Sol. D + 1000 mL água desionizada

Sol. C - 2, 8 g FeCl₃ em 100mL de 0,1 HCl

Sol. D - 3, 9 g EDTANa₂ em 100mL de 0,1 NaOH

Quadro 10 – Solução de micronutrientes. As quantidades foram adicionadas a 1000 mL de água desionizada (Churro, 2007)

Quantidade	Composto
3,1	H ₃ BO ₃ NO ₃
0,22	ZnSO ₄ · 7H ₂ O
2,23	MnSO ₄ · 4H ₂ O
0,033	Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O
0,054	VO ₂ SO ₄ · 6H ₂ O
0,146	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O
0,088	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O
0,474	Al ₂ (SO ₄) ₃ · 2H ₂ O
0,198	Ni SO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ · 6H ₂ O
0,083	KI
0,119	KBr
0,037	Cr(NO ₃) ₃ · 7H ₂ O
0,154	Cd(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O